

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
Institut für Immunologie
Leiter: Prof. Dr. D. Gemsa

**Differentielle Induktion der Chemokin- und
Zytokinsynthese und funktionelle Veränderungen der
Chemokinrezeptorexpression in humanen Monozyten
und Makrophagen durch bakterielle Moduline,
Influenza A-Virus und Virosomen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Theoretische Medizin)

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Andreas Kaufmann

aus Hünfeld

Marburg 1998

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 30.07.98

Gedruck mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Prof. Dr. D. Gemsa
Korreferent:	Prof. Dr. B. Steiniger

Für Kerstin und Laura

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1.	Allgemeines zur Immunabwehr	1
2.	Monozyten/Makrophagen	1
2.1.	Ursprung und Struktur der Monozyten/Makrophagen	2
2.2.	Funktionen der mononuklearen Phagozyten	4
2.3.	Sekretorische Funktionen von Makrophagen	5
2.4.	Aktivierung von Monozyten/Makrophagen	5
3.	Neutrophile Granulozyten	9
3.1.	Ursprung und Struktur der neutrophilen Granulozyten	9
3.2.	Funktionen und sekretorische Aktivitäten der neutrophilen Granulozyten	10
3.3.	Aktivierung von neutrophilen Granulozyten	12
4.	Chemokine	13
4.1.	Strukturelle und funktionelle Einteilung der Chemokine	14
4.2.	Leukozytenwanderung: Chemokine als Mediatoren	16
4.3.	Charakterisierung der Chemokine	17
4.4.	Proteolytische Prozessierung und Inaktivierung	19
4.5.	Chromosomale Lokalisation und Regulation der Genexpression	19
4.6.	Produzenten der Chemokine	20
4.7.	Biologische Aktivitäten der Chemokine	22
4.8.	Die Rolle der Chemokine bei Erkrankungen	24
4.9.	Chemokinrezeptoren	26
4.9.1.	CXC-Chemokinrezeptoren	26
4.9.2.	CC-Chemokinrezeptoren	27

5.	Zytokine	30
5.1.	TNF- α	31
5.2.	IL-6	32
5.3.	IL-10	32
6.	Influenza A Viren	33
6.1.	Klassifizierung und Einordnung des Virusstammes A/PR/8	33
6.2.	Struktur und Charakterisierung von Influenza A Viren	34
6.3.	Funktionen der viralen Proteine	35
6.4.	Vermehrungszyklus von Influenza A Viren	36
6.5.	Antigendrift und Antigen shift	38
6.6.	Pathogenese und Klinik der Erkrankung	39
7.	Interaktion von Viren mit mononuklearen Zellen	39
7.1.	Wechselwirkungen zwischen Influenza A Viren und Makrophagen	41
7.2.	Zytokinmuster Influenza A/PR/8-infizierter mononuklearer Phagozyten	41
8.	Bakterielle Moduline	43
8.1.	LPS	44
8.2.	MALP-2	46
8.3.	OspA	47
8.4.	LTA	47
9.	Zielsetzung	48

II. Material und Methoden

1.	Medien, Zellen und Virusstamm	51
1.1.	Medien	51
1.2.	Zellen	51
1.2.1.	Primäre Zellen	51
1.2.2.	Zelllinien	51
1.2.2.1.	Mono Mac 6 Zellen	51
1.2.2.2.	THP-1 Zellen	52
1.2.2.3.	MDCK II Zellen	53
1.2.3.	Testsysteme zur Kultivierung der Zellen	54
1.2.3.1.	Überprüfung der Zellkulturen auf Mykoplasmen	54
1.2.3.2.	LAL-Test zum Ausschluß von Endotoxinkontaminationen	54
1.2.4.	Bestimmung der Zellzahl	55
1.2.5.	Überprüfung der Zellvitalität	55
1.2.5.1.	Trypanblau-Färbung	55
1.2.5.2.	Messung der Stoffwechselaktivität von Zellen mit MTT	55
1.3.	Viren	56
1.4.	Chemikalien	56
1.4.1.	Medien und Medienzusätze	56
1.4.2.	Farbstoffe	57
2.	Methoden	57
2.1.	Isolierung und Anreicherung humaner Blutleukozyten	57
2.2.	Isolierung und Anreicherung humaner neutrophiler Granulozyten	58
2.3.	Elutriation („Counter flow-Zentrifugation“)	59
2.4.	Bestimmung des Reinheitsgrades der präparierten neutrophilen Granulozyten	62

2.5.	Bestimmung des Reinheitsgrades der durch Elutriation präparierten Monozyten	62
2.5.1.	Alpha-Naphthylacetat-Esterase-Färbung	62
2.5.2.	Differentielle Blutbildfärbung	63
2.5.3.	FACS-Analyse, Durchflußzytometrie	63
2.6.	Stimulation und Infektion der Zellen mit bakteriellen Modulinen bzw. Influenza A/PR/8	64
2.6.1.	Stimulation der Monozyten mit bakteriellen Modulinen	64
2.6.2.	Stimulation der Zelllinien mit LPS	65
2.6.3.	Infektion der Monozyten mit Influenza A/PR/8 und Stimulation durch Virosomen	66
2.6.4.	Inkubation der Monozyten in Teflongefäßen	66
2.7.	Vermehrung und Reinigung von Influenza A-Viren	67
2.7.1.	Vorbereitung der Eier und Beimpfung	67
2.7.2.	Ernte der virushaltigen Allantoisflüssigkeit	68
2.7.3.	Reinigung des Influenza A-Virus	68
2.7.4.	Dialyse und Lagerung	69
2.8.	Inaktivierung von Influenza A-Viren	70
2.8.1.	UV-Inaktivierung	70
2.8.2.	Inaktivierung bei 56° C	70
2.8.3.	Inaktivierung bei 100° C	70
2.9.	Virosomen	71
2.9.1.	Virosomenpräparation	71
2.9.2.	Western Blot (Dot Blot) zum Nachweis von Virusproteinen	72
2.10.	Chemotaxis	74
2.10.1.	Monozyten-Chemotaxis	75
2.10.2.	Neutrophilen-Chemotaxis	76
2.11.	ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	77
2.11.1.	IL-8 ELISA	79
2.11.2.	GRO- α ELISA	79
2.11.3.	MCP-1 ELISA	80

2.11.4.	MCP-3 ELISA	80
2.11.5.	MIP-1 α ELISA	81
2.11.6.	MIP-1 β ELISA	81
2.11.7.	RANTES ELISA	82
2.11.8.	IL-1 β ELISA	82
2.11.9.	IL-6 ELISA	83
2.11.10.	IL-10 ELISA	83
2.11.11.	TNF- α ELISA	84
2.12.	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	84
2.12.1.	Northern Blot-Analyse der Genexpression	85
2.12.1.1.	Präparation von RNA	85
2.12.1.2.	Agarose-Gelelektrophorese für RNA	87
2.12.1.3.	Northern Blot	89
2.12.1.4.	Nicht-radioaktive Hybridisierung	90
2.12.1.5.	Detektion der hybridisierten RNA	91

III. Ergebnisse

1.	Einfluß des Differenzierungsgrades von Monozyten auf die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation mit LPS oder Infektion mit Influenza A-Virus	94
1.1.	Chemokin- und Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit LPS	94
1.1.1.	Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA	94
1.1.2.	Analyse der Chemokin mRNA-Expression	97
1.1.3.	Funktionelle Analyse der differentiellen Chemokinfreisetzung im Chemotaxisassay	98
1.2.	Chemokin- und Zytokinfreisetzung nach Infektion mit Influenza A/PR/8	100
1.2.1.	Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA	100

1.2.2.	Funktionelle Analyse der differentiellen Chemokinfreisetzung im Chemotaxisassay	102
2.	Toleranzinduktion in primären humanen Monozyten	104
2.1.	Toleranzinduktion in humanen Monozyten durch LPS	104
2.1.1.	Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA	104
2.1.2.	Analyse der Chemokin- und Zytokin-mRNA-Expression nach Toleranzinduktion durch LPS	112
2.1.3.	Funktionelle Analyse des Einflusses einer differentiellen Desensibilisierung der Chemokinfreisetzung im Chemotaxisassay	114
2.1.4.	Einfluß von PMA und Zymosan auf die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen in Toleranz-induzierten humanen Monozyten	116
2.2.	Toleranzinduktion in humanen Monozyten durch IL-10	118
2.2.1.	Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA	118
3.	Toleranzinduktion in humanen Zelllinien	122
3.1.	Toleranzinduktion in Mono Mac 6 Zellen durch LPS	122
3.1.1.	Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA	122
3.2.	Fehlende Toleranzinduktion in Mono Mac 6 Zellen durch IL-10	124
3.2.1.	Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA	124
3.3.	Fehlende Toleranzinduktion in THP-1 Zellen durch LPS	126
3.3.1.	Analyse der Proteinfreisetzung im ELISA	126
3.4.	Fehlende Toleranzinduktion in THP-1 Zellen durch IL-10	127
3.4.1.	Analyse der Proteinfreisetzung im ELISA	127
4.	Chemokin- und Zytokinfreisetzung durch MALP-2	129
4.1.	Änderung der Morphologie nach MALP-2-Stimulation	129
4.2.	Dosisabhängigkeit der Chemokin- und Zytokinfreisetzung durch MALP-2	131
4.3.	Kinetik der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach	

4.4.	Analyse der Chemokin- und Zytokin-mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit MALP-2	135
4.5.	Toleranzinduktion durch MALP-2	137
4.5.1.	Analyse der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch ELISA	137
4.5.2.	Analyse der Chemokin-mRNA-Expression nach Toleranzinduktion durch MALP-2	138
4.5.3.	Einfluß von PMA und Zymosan auf die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen in MALP-2 toleranten Monozyten	140
5.	Chemokin- und Zytokininduktion durch OspA	142
5.1.	Änderung der Morphologie nach OspA-Stimulation	142
5.2.	Dosisabhängigkeit der Chemokin- und Zytokinfreisetzung durch OspA	144
5.3.	Kinetik der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation mit OspA	146
5.4.	Toleranzinduktion durch OspA	148
5.4.1.	Analyse der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch ELISA	148
5.4.2.	Funktionelle Analyse der Chemokinfreisetzung im Chemotaxisassay	149
6.	Chemokin- und Zytokinfreisetzung nach Stimulation humaner Monozyten mit Virosomen	151
6.1.	Kontrolle der Virosomenpräparation	152
6.1.1.	Struktur der Virosomen	152
6.1.2.	Infektiosität der Virosomen	153
6.1.3.	Nachweis virosomaler Proteine in Dot Blot	154
6.2.	Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation humaner Monozyten mit Virosomen	156
6.2.1.	Suppression der CXC-Chemokinfreisetzung nach Stimulation mit Virosomen	156

6.2.3.	Fehlende Induktion proinflammatorischer Zytokine durch Virosomen	158
6.2.4.	Antikörper gegen HA heben die Virus- und Virosomen-induzierte IL-8-Suppression auf	160
6.2.5.	Lösliche HA-Moleküle bewirken keine Suppression der IL-8-Freisetzung	161
7.	Chemokinrezeptorexpression	163
7.1.	Kultivierung der Monozyten in Teflongefäßen	163
7.1.1.	Kultivierung in Teflongefäßen: Recovery und Zellvitalität	164
7.1.2.	Morphologische Veränderungen	164
7.1.3.	Phagozytose fluoreszenzmarkierter Latexpartikel	166
7.1.4.	Chemokin- und Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS	168
7.2.	Funktionelle Analysen der Chemokinrezeptorexpression	171
7.2.1.	Einfluß des Differenzierungsgrades auf das Migrationsverhalten der Monozyten	171
7.2.2.	Einfluß von Chemokinen auf das Migrationsverhalten der Monozyten	173
7.2.3.	Einfluß von LPS auf das Migrationsverhalten der Monozyten	174
7.2.4.	Einfluß von Influenza A-Viren auf das Migrationsverhalten primärer Monozyten	176
7.2.5.	FACS-Analyse der Chemokinrezeptorexpression Influenza A/PR/8 infizierter humaner Monozyten	179
IV.	Diskussion	182
1.	Die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation mit LPS oder Infektion mit Influenza A-Virus ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Monozyten	183

2.	Monozyten reagieren auf die Stimulation mit den bakteriellen Modulinen MALP-2 und OspA mit einer gesteigerten Chemokin- und Zytokinfreisetzung	188
3.	Veränderte Induktion von Chemokinen und Zytokinen nach Restimulation humaner Monozyten mit bakteriellen Modulinen	193
4.	Die Suppression der Freisetzung der CXC-Chemokine in Influenza A/PR/8-infizierten Monozyten wird durch das membranassoziierte HA-Molekül vermittelt	200
5.	Chemokinrezeptorexpression	204
V.	Zusammenfassung	209
VI.	Literaturverzeichnis	212

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A/PR/8	Influenza A/PR/8/34
Aqua dest.	Entionisiertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
CSF	colony-stimulating factor
CTAB III	connective tissue-activating peptide III
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimehtylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetales Kälberserum
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-Phenylalanin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	granulocyte-colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRO	growth-related oncogene
HA	Hämagglutinin
HAU	hemagglutination units
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	interferon γ inducible protein-10
kD	kilo-Dalton
LAL	Limulus amoebocyte lysate

LT	Leukotrien
LTA	Lipoteichonsäure
M	Matrixprotein
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Protein-2
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	macrophage-colony-stimulating factor
MDCK	Madin und Darby canine kidney cell
Mig	monokine induced by IFN- γ
MIP	macrophage inflammatory protein
MOI	multiplicity of infektion
MPS	mononucleäres Phagozytensystem
mRNA	messenger-RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
N	Nukleoprotein
NA	Neuraminidase
NAP	neutrophil activating protein
NF	nukleärer Faktor
OD	optische Dicht
OPD	o-Phenylendiamin-dihydrochlorid
OspA	outer surface protein A
PAF	platelet activating factor
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBP	platelet basic protein
PBS	phosphate buffered saline
PF-4	platelet factor 4
PHA	Phytohämagglutinin
RANTES	regulated on activationnormal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	RPMI-Medium
SCF	stem cell factor
SD	Standardabweichung
SDF-1	stromal derived factor 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
UV	ultraviolett

I. Einleitung

1. Allgemeines zur Immunabwehr

Das menschliche Immunsystem besteht aus ca. 1 Billion Zellen, die zwischen Blut und Lymphe zirkulieren, in anatomisch definierten Ansammlungen der lymphoiden Organe vorkommen oder als vereinzelte Zellen in fast allen Geweben anzutreffen sind. Die Fähigkeit dieser Zellen zu zirkulieren und der ständige Austausch zwischen Blut, Lymphe und Gewebe ist von entscheidender Bedeutung für die Erkennung körperfremder Stoffe, insbesondere von Krankheitserregern, und deren Elimination.

Das Immunsystem läßt sich in 2 funktionelle Untereinheiten unterteilen, in das unspezifische und das spezifische Immunsystem (Roitt et al., 1987). Träger der spezifischen Immunantwort sind Lymphozyten. Hierbei unterscheidet man zwischen humoraler Immunität, die von B-Zellen vermittelt wird, und der durch T-Zellen vermittelten zellulären Immunität. Die unspezifische Immunität also, ohne spezifische Antigenerkennung, ist die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen, und die meisten potentiellen Krankheitserreger werden unschädlich gemacht, bevor sie eine erkennbare Infektion verursachen können. Funktionsträger der unspezifischen Immunabwehr sind Phagozyten, natürliche Killerzellen und lösliche Faktoren wie z.B. Lysozym, Komplement oder Akute-Phase-Proteine. Zu den Phagozyten gehören Granulozyten und Monozyten/Makrophagen.

2. Monozyten/Makrophagen

Die von Monozyten abstammenden, phagozytisch aktiven Zellen werden unter der Bezeichnung mononukleares Phagozytensystem, MPS (frühere Bezeichnung: retikuloendotheliales System, RES) zusammengefaßt (van Furth et al., 1982). Hierzu gehören Makrophagen der verschiedenen Körperhöhlen und Gewebe,

Kupffer-Zellen der Leber, Alveolarmakrophagen der Lunge, Histiozyten, multinukleare Osteoklasten und Mikrogliazellen im ZNS.

Die Zellen des mononuklearen Phagozytensystems spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und der Abwehr von Krankheitserregern (Paul et al., 1993). Sie besitzen die Fähigkeit, durch Freisetzung modulatorischer Moleküle, wie z. B. der Zytokine IL-1 (Interleukin 1), TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) oder IL-6 (Interleukin 6) die Regulation der Immunantwort zu beeinflussen. Weiterhin wird durch die Sekretion chemotaktisch wirkender Proteine die weitere Einwanderung immunkompetenter Zellen reguliert. Ihre wichtige Funktion als Effektorzellen einer Immunantwort wird durch die Fähigkeit zur Präsentation von prozessierten Antigenen über MHC II-Moleküle an CD 4⁺ T-Lymphozyten erfüllt.

2.1. Ursprung und Struktur der Monozyten/Makrophagen

Die Vorläuferzellen von Makrophagen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks (Volkman et al., 1963). Diese wiederum leiten sich aus dem embryonalen Mesenchym ab. Unter dem Einfluß von Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren („colony-stimulating factors“, CSF's), welche die weitere Zellteilung und -differenzierung steuern, entwickeln sich aus den pluripotenten Zellen lymphozytäre und myeloische Stammzellen.

Durch die Wirkung von Interleukin 3 (IL-3, früher Multi-CSF) gliedert sich die myeloische Zellreihe in vier Entwicklungslinien auf: die erythrozytäre Linie, die megakaryozytäre Linie, die Linie der eosinophilen Granulozyten und die granulozytär-monozytäre Linie.

M-CSF (Makrophagen-CSF oder CSF-1) differenziert die Vorläuferzellen der granulozytär-monozytären Linie zu Monoblasten. Unter dem Einfluß von G-CSF (Granulozyten-CSF) reifen die Zellen zu neutrophilen und basophilen Granulozyten. Monoblasten differenzieren sich zu Promonozyten und werden nach der letzten Zellteilung als Monozyt in die Blutzirkulation entlassen. Nach ca. 24 Stunden verlassen die Monozyten die Blutbahn und emigrieren in das umliegende Gewebe. Hier findet die weitere Differenzierung zu Makrophagen

statt. Unter normalen Umständen sind Monozyten und Makrophagen nicht mehr teilungsfähig (Gemsä et al., 1997).

Die Monozytopoese wird durch die Regulation des M-CSF-Spiegels gesteuert (Bartocci et al., 1987). M-CSF ist im Blut in physiologischen Konzentrationen vorhanden. Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen sind die Hauptproduzenten von M-CSF. Makrophagen besitzen spezifische M-CSF-Rezeptoren, die ihre Liganden mit hoher Affinität binden. Differenzierte Makrophagen reagieren auf das rezeptorvermittelte Signal nicht mehr mit einer weiteren Proliferation. Der M-CSF-Spiegel korreliert umgekehrt proportional zur Konzentration an Gewebsmakrophagen (negativer feedback-Mechanismus).

Diese Regulation der Monozytopoese wird auch durch andere Zytokine beeinflusst. IL-1 und TNF- α erhöhen die Freisetzung von M-CSF aus Fibroblasten und Endothelzellen. IL-1 bewirkt eine verstärkte Antwort der Knochenmarksstammzellen auf M-CSF. Andere Zytokine, wie z.B. MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1) und TGF- β (transforming growth factor-beta), die während einer Entzündung freigesetzt werden, inhibieren die Antwort von Vorläuferzellen der Monozyten auf M-CSF.

Der Monozyt ist die größte Zelle des Blutes und hat einen Durchmesser von etwa 10-15 μm . Er hat eine unregelmäßige Zellbegrenzung, Vakuolen als Zeichen einer gut ausgebildeten Phagozytosefähigkeit, einen meist eingebuchteten, ovalen oder hufeisenförmigen Kern, ein locker strukturiertes Chromatin und ein Zytoplasma mit azurophilen Granula (Junqueira et al., 1986). Werden Monozyten aus dem Blut isoliert und in ein Kulturgefäß gegeben, adhären sie und breiten sich über die Oberfläche aus.

Im Blut eines Erwachsenen zirkulieren etwa $1,7 \times 10^9$ Monozyten und repräsentieren damit 2-8 % aller Blutleukozyten.

Wichtig zu bemerken ist, daß Monozyten keine unreifen Vorläuferzellen sind, sondern gut phagozytieren können, zytotoxische Aktivität entfalten und bereits viele biologisch aktive Mediatoren sezernieren (Gemsä et al., 1997).

Makrophagen unterscheiden sich von Monozyten in ihren Enzymaktivitäten, ihren phagozytischen Fähigkeiten und ihren Zelloberflächencharakteristika, wie z.B. der

verstärkten Expression von CD 16 und den Adhäsionsmolekülen der β_2 -Integrinfamilie.

2.2. Funktionen der mononuklearen Phagozyten

Die Zellen des MPS antworten in zweifacher Weise auf verschiedene Stimuli. Zum einen werden extrazelluläre Signale über Rezeptoren gebunden, internalisiert und im endozytischen Stoffwechselweg abgebaut; zum anderen wird die Expression bioaktiver Moleküle induziert, die die Makrophagenantwort auf die wechselnde Umgebung anpassen. Durch diese beiden Grundmechanismen sind Makrophagen in der Lage, Entzündungsprozesse und immunologische Reaktionen aktiv zu beeinflussen.

Spezifische Rezeptoren für Immunglobuline ($\text{Fc}\gamma\text{R}$, $\text{Fc}\mu\text{R}$) und Komplementfaktoren (C3bR) steigern die Phagozytoserate von opsonisierten Partikeln durch Makrophagen um mehr als das 100-fache und sind somit von entscheidender Bedeutung für den Abbau von Mikroorganismen und Immunkomplexen.

Weiterhin besitzen Makrophagen Rezeptoren für $\text{IFN-}\gamma$, IL-1, IL-6, $\text{TNF-}\alpha$, M-CSF, Lipoproteine, Peptide und Polysaccharide (Gemsä et al., 1997).

Diese Oberflächenrezeptoren ermöglichen die Kommunikation mit der Umgebung und versetzen die Makrophagen in die Lage, sich den ständig wechselnden Bedingungen anzupassen und entsprechend auf die Veränderungen zu reagieren. Als erste Abwehrfront bei einer Primärinfektion mit Viren spielen die Zellen des mononuklearen Phagozytensystems die entscheidende Rolle, da die Reaktion des spezifischen Immunsystems erst nach einigen Tagen wirksam wird (Mogenson et al., 1979).

Weiterhin besteht eine wichtige Interaktion zwischen dem MPS und dem spezifischen Immunsystem. Die Antigenpräsentation und die Sekretion von Monokinen durch Makrophagen führt zur Aktivierung von T-Lymphozyten. Diese wiederum sezernieren Produkte zur B-Lymphozyten- und Makrophagenaktivierung

(Abbas et al., 1994). Über diesen Mechanismus besteht eine wechselseitige Regulation des unspezifischen mit dem spezifischen Immunsystems.

Zusammenfassend lassen sich die Hauptfunktionen der Makrophagen wie folgt darstellen (Gemsa et al., 1997):

- 1) Phagozytose von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Parasiten), geschädigten Zellen, gealterten Erythrozyten und Immunkomplexen
- 2) Sekretion einer Vielzahl von Substanzen (siehe Tabelle 1)
- 3) Immunregulation (Kooperation mit Lymphozyten über Antigenprozessierung und -präsentation, Expression von regulatorischen Molekülen wie z. B. Adhäsionsmolekülen und Kostimulatoren der T-Zellantwort, Sekretion von Monokinen, Chemokinen und unspezifischen Immunsuppressoren)
- 4) Zytotoxizität gegenüber Parasiten, Tumorzellen, transplantierten Zellen und virusinfizierten Zellen.

2.3. Sekretorische Funktionen von Makrophagen

Makrophagen zählen zu den sekretorisch aktivsten Zellpopulationen (Nathan et al., 1987). Die meisten der sezernierten Moleküle werden nach Stimulation und Aktivierung freigesetzt. Aktivierungsstimuli sind z. B. bakterielle Produkte oder Zytokine. Die Menge der sezernierten Moleküle ist abhängig vom Grad der Differenzierung und der Gewebslokalisation. Anders als bei Lymphozyten scheinen stabile Subpopulationen bei Makrophagen nicht zu existieren (Gemsa et al., 1997). Hieraus ergibt sich eine hohe Flexibilität, d. h. Makrophagen sind in der Lage, sich an die jeweilige Umgebung anzupassen und je nach Stimulationssignal ihre Aktivität zu verändern. Eine Übersicht über die wichtigsten Makrophagenprodukte zeigt Tabelle 1.

2.4. Aktivierung von Monozyten/Makrophagen

Zirkulierende Monozyten wandern nach ca. 24 Stunden in die verschiedenen

Transitzeit im Blut auf ca. 10 Stunden verkürzt werden. Nach dem Auswandern aus der Zirkulation differenzieren sich Monozyten im Gewebe und in den Körperhöhlen zu Makrophagen aus. Ohne ihre typischen Eigenschaften zu verlieren, werden sie durch das umliegende Wirtsgewebe für zusätzliche, spezielle Funktionen geprägt (z.B. Alveolarmakrophagen der Lunge, Osteoklasten des Knochens).

Im nicht-entzündeten Organismus kommen Makrophagen als residente (ruhende) Zellen im Gewebe vor. Ihre Hauptaufgabe ist die Entfernung untergegangener Zellen (scavenger cells). Im Rahmen eines Entzündungsprozesses werden sowohl die chemotaktisch angelockten Monozyten, als auch die bereits vorhandenen residenten Makrophagen für den Empfang von Aktivierungssignalen sensibilisiert. Der höchste Aktivierungsgrad von Makrophagen wird in der Regel erst durch die Einwirkung von 2 Signalen erreicht (2 Signalthypothese) (Hamilton et al., 1987; Gernsma et al., 1984). Das erste Signal, das wirksam werden muß, versetzt die Makrophagen in einen rezeptiven Zustand („Priming-Signal“). Als solche Signale können Lymphokine wirksam werden, wie z.B. IFN- γ , GM-CSF und verschiedene makrophagenaktivierende Faktoren (MAF's). Durch ein zweites, auslösendes Signal wie z.B. Endotoxin oder einer Kombination aus IL-1 und TNF- α wird der Makrophage dazu veranlaßt, volle Aktivierung zu zeigen („Trigger-Signal“).

Nur eine Kombination aus Priming- und Trigger-Signal führt dazu, daß Makrophagen ihren maximalen Aktivierungsgrad erreichen und versetzt sie in die Lage, bakterizide oder tumorizide Eigenschaften zu zeigen.

Bei der Regulation der Makrophagenaktivierung spielt das von den Makrophagen selbst produzierte Prostaglandin E eine wesentliche Rolle, indem es die durch IFN- γ induzierte Makrophagenaktivierung inhibiert (Taffet et al., 1981).

Was mit Makrophagen nach ihrer Aktivierung geschieht, wird bis heute noch recht kontrovers diskutiert. Zum einen wird davon ausgegangen, daß einmal aktivierte Makrophagen nach Erfüllung ihrer Aufgabe zu lokalen Lymphknoten wandern und dort sterben (van Furth et al., 1982). Zum anderen wird diskutiert, daß aktivierte Makrophagen wieder deaktiviert werden können.

In vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß aktivierte Makrophagen nach einiger Zeit absterben (Sprenger, 1989). Dieser Vorgang konnte durch wiederholten

Mediumwechsel verzögert werden. Allerdings war eine wiederholte Aktivierung dieser Makrophagen nicht mehr möglich.

Ob der Zelltod aktivierter Makrophagen genetisch programmiert ist oder auf die von den Makrophagen selbst sezernierten toxischen Produkte zurückzuführen ist, ist bisher nicht weiter untersucht worden. Auch ist noch unklar, inwieweit diese in vitro Beobachtungen auf die in vivo Situation übertragen werden können.

Tab. 1: Sekretorische Produkte von Makrophagen (Paul et al., 1993)

Enzyme und Serumproteine

- Elastase, Kollagenase, Lysozym, Plasminogenaktivator

Proteine, die in Abwehr und Entzündung involviert sind

- Komplementfaktoren (C2, C3, C4, C5, Faktor B, D, H, I)
- Interferon α und β
- Fibronektin

Zytokine, die Entzündungsprozesse fördern und die Lymphozytenantwort regulieren

- IL-1, IL-6, IL-8, IL-12
- TNF- α

Chemotaktische Zytokine als Mediatoren der Leukozytenwanderung

- IL-8, GRO, MCP-1, MIP-1 α , RANTES

Inhibitorische Zytokine

- IL-10, TGF- β 1, -2, -3
- IL-1 Rezeptor-Antagonist

Zytokine für die Gewebsheilung nach Entzündungsreaktionen

- PDGF (platelet-derived growth factor)
- FGF (fibroblast growth factor)

Faktoren zur Regulation von Wachstum und Differenzierung

- G-CSF, GM-CSF, M-CSF

Sonstige Produkte

- Arachidonsäurederivate
- PAF (platelet-activating factor)
- reaktive Sauerstoffmetabolite
- NO (Nitric oxide)

3. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen die erste, schnell mobilisierbare Leukozytenbarriere gegen bakterielle Infektionserreger dar. Mit 60-70 % bilden sie die Mehrheit der zirkulierenden Leukozyten. Ihre Lebenszeit beträgt höchstens 2-3 Tage. Aufgrund ihrer Fähigkeit, bereits auf geringe chemotaktische Reize reagieren zu können, sind sie am raschesten und in hoher Zahl an einem Ort bakterieller Infektion oder zerfallenden Gewebes anzutreffen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Phagozytose und dem intrazellulären Abtöten von Bakterien, wobei offensichtlich mehr ihre große Zahl, als die Fähigkeit sich langfristig mit Mikroorganismen auseinanderzusetzen, die Hauptrolle spielt (Gemsa et al., 1997). Die bei diesen Vorgängen freigesetzten vasoaktiven Inhaltsstoffe der neutrophilen Granulozyten sind die Hauptursache für das Auftreten der typischen Entzündungszeichen.

3.1. Ursprung und Struktur der neutrophilen Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten leiten sich aus den gleichen myeloischen Stammzellen ab wie Monozyten. Unter dem Einfluß von G-CSF (Granulozyten-CSF) entwickeln sich im Knochenmark aus den Vorläuferzellen, den Myeloblasten, basophile und neutrophile Granulozyten. Die Zytokine, die die Granulopoese modulieren, können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Faktoren der Gruppe I wie z.B. IL-3, GM-CSF, IL-6 und SCF (stem cell factor) beeinflussen die Proliferation und Differenzierung der unreiferen Vorläuferzellen. Für die weitere Differenzierung in linienspezifische Vorläuferzellen ist der Einfluß von Faktoren der Gruppe II wie z.B. G-CSF, M-CSF, und Erythropoietin verantwortlich (Abramson et al., 1993).

Etwa 60 % des Knochenmarks sind für die laufende Produktion von neutrophilen Granulozyten angelegt. Pro Minute werden ca. 80 Millionen Zellen gebildet. Nach dem Verlassen des Knochenmarks zirkulieren neutrophile Granulozyten 8-10 Stunden, wobei sich etwa die Hälfte der Zellen wandständig im kapillaren Netzwerk befindet (Margination) und bei Bedarf z.B. einer Entzündung rasch

mobilisiert werden kann. Die relativ kurze Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten lässt sich durch ihre nur sehr gering ausgeprägte Fähigkeit zur Resynthese von Proteinen erklären (Gemsa et al., 1997).

Neutrophile Granulozyten haben einen Durchmesser von etwa 6-9 μm . Der Zellkern hat eine variable Form. Bei Jugendformen ist er in der Regel stabförmig. Bei reifen Neutrophilen besteht der Kern aus meist drei Segmenten, die untereinander durch feine Chromatinfäden verbundenen sind. Die Anzahl der Segmente steigt mit zunehmender Alterung. Kennzeichnend für das Zytoplasma ist das Vorkommen membranumschlossener, neutrophiler Granula (50-200 pro Zelle). Weiterhin findet sich im Zytoplasma reifer Zellen nur ein zartes, rauhes endoplasmatisches Retikulum, wenige freie Ribosomen, ein paar Mitochondrien und Reste eines Golgiapparates (Junqueira et al., 1986).

3.2. Funktionen und sekretorische Aktivitäten der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten besitzen einen hohen Gehalt an Granula. Zu unterscheiden sind primäre, azurophile und sekundäre, spezifische Granula. Es wurde außerdem ein dritter Granulatyp beschrieben, der Gelatinase enthält, dessen Eigenschaften allerdings noch unklar sind. Die beiden charakterisierten Granulatypen werden im Golgiapparat gebildet, jedoch an verschiedenen Stellen und während unterschiedlicher Differenzierungsstadien der Zellen.

Die ersten Granula, die während der Reifung auftreten, sind die primären oder azurophilen Granula, die etwa rund ein Drittel aller Granula der reifen Zelle ausmachen. Sie enthalten degradierende Enzyme, wie z.B. Myeloperoxidase und Lysozym, saure Hydrolasen und antimikrobizide kationische Proteine. Die primären Granula erfüllen ihre Funktion vor allem im intrazellulären Milieu. Hier verschmelzen sie mit phagozytiertem Material zu Phagolysosomen und sind somit direkt in die Degradation von Mikroorganismen involviert.

Sekundäre oder spezifische Granula treten in einem späteren Zeitpunkt der Neutrophilenreifung auf. Sie enthalten die leukozytenspezifischen Proteine

Granula werden sie durch Exozytose in den Extrazellarraum freigesetzt. Dieser Vorgang wird als Degranulation bezeichnet. Neben verschiedenen entzündungsfördernden Substanzen enthalten die sekundären Granula verschiedene Membrankomponenten, wie z.B. Rezeptoren für iC3b, Laminin und Formylpeptide, signaltransduzierende G-Proteine, Cytochrom b 558, Plasminogenaktivator und alkalische Phosphatase (Paul et al., 1993). Die Translokalisierung dieser Komponenten zur Zelloberfläche ist von großer Bedeutung für die Margination von Neutrophilen in der Mikrovaskulatur, die Adhärenz an Endothelzellen, das Durchwandern von Gefäßwänden (Diapedese), die gerichtete Migration entlang eines aufsteigenden Gradienten (Chemotaxis), die Aktivierung des mikrobiziden Stoffwechselweges und die Regulation einer Entzündung.

Über diese präformierten Granulabestandteile hinaus besitzen neutrophile Granulozyten die Fähigkeit, auf Stimulation mit der Neusynthese von plättchenaktivierendem Faktor (PAF), Eicosanoiden wie Leukotrien B₄, Prostaglandin E₂ und Freisetzung von aktivierten Sauerstoffmetaboliten zu antworten. Auch diese Mediatoren besitzen entzündungsfördernde Eigenschaften (Gemsä et al., 1997).

Zusammenfassend lassen sich die Hauptfunktionen der neutrophilen Granulozyten wie folgt darstellen (Gemsä et al., 1997):

- 1) Phagozytose von Mikroorganismen, Abbau von Zelltrümmern und Fremdstoffen
- 2) Keimabtötung
- 3) Synthese von Entzündungsmediatoren

Im Gegensatz zu Monozyten/Makrophagen exprimieren neutrophile Granulozyten keine MHC II-Moleküle. Deshalb ist eine Immunregulation in Kooperation mit Lymphozyten über Antigenprozessierung und -präsentation nicht möglich.

Eine Übersicht über die wichtigsten Granulozytenprodukte und ihrer Funktion im Entzündungsgeschehen zeigt Tabelle 2.

Tab. 2: Granulozytenprodukte und ihre Funktion (Paul et al., 1993)

<u>Primäre (azurophile) Granula</u>	
- saure Hydrolasen (Kathepsine)	Zerstörung von SH-Brücken
- Kollagenasen, Elastase	Abbau von Kollagen, Gewebeerstörung
- Myeloperoxidase	katalysiert $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HOCl}$
<u>Sekundäre (spezifische) Granula</u>	
- Komplementaktivatoren	chemotaktische Substanzen und Opsonine
- chemotaktische Proteine	Rekrutment von Leukozyten
- Lactoferrin	vermittelt Adhärenz der Neutrophilen
- fMLP-Rezeptoren	Chemotaxis
- CR3	Adhärenz, Margination, Phagozytose
- Plasminogenaktivator	Spaltung von C5a aus C5
<u>tertiäre Granula</u>	
- Gelatinase	Funktion unbekannt
<u>Aktivierungsinduzierte Produkte</u>	
- PAF, Eicosanoide	Entzündungsmediatoren
- aktivierte Sauerstoffprodukte	Oxidation

3.3. Aktivierung von neutrophilen Granulozyten

Eine Invasion von neutrophilen Granulozyten wird überwiegend bei bakteriellen Infektionen sowie bei akuten Zellnekrosen gefunden. Hierbei kommt es zu einer verstärkten Freisetzung chemotaktisch wirkender Substanzen, wie z.B. C5a, Leukotrien B₄ (LTB₄), das bakterielle Tripeptid fMLP (formyl Met-Leu-Phe) und Chemokinen, welche durch Endothelzellen von der extravasculären zur luminalen Zelloberfläche transportiert und in einer immobilisierten Form präsentiert werden. Weiterhin bewirkt die Entzündungsreaktion die Aktivierung der Endothelzellen, wodurch eine verstärkte Produktion weiterer chemotaktischer Faktoren hervorgerufen wird. Die angelockten neutrophilen Granulozyten werden bereits in der Zirkulation durch diese chemotaktisch wirkenden Substanzen voraktiviert („Priming“). Hierbei kommt es zu einer stark erhöhten Expression von Rezeptoren

Immunglobuline und Komplementfaktoren. Die so voraktivierten Zellen zeigen zusätzlich eine erhöhte Adhärenz. Es kommt zur Diapedese der Zellen und dem Einwandern in das Entzündungsgebiet entlang eines chemotaktischen Gradienten (Chemotaxis). Im Entzündungsgebiet entwickeln die neutrophilen Granulozyten ihre volle funktionelle Aktivität. Dazu gehört vor allem die Phagozytose opsonisierter Partikel und die dabei auftretende Freisetzung biologisch aktiver Substanzen (Abramson et al., 1993).

Da neutrophile Granulozyten nur in sehr geringem Maße zur Neusynthese von Proteinen fähig sind, sterben sie sehr rasch nach Phagozytose und Abtötung von Mikroorganismen. Die bei dieser Autolyse auftretenden Zerfallsprodukte und unvollständig abgebauten Bestandteile der Mikroorganismen sind für die Aufrechterhaltung der weiteren Entzündungsreaktion verantwortlich.

In das Entzündungsgebiet eingewanderte Makrophagen sind für die Beseitigung der Zerfallsprodukte und die anschließende Reparaturphase zuständig (Gemsa et al., 1997).

4. Chemokine

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine („chemoattractant cytokines“). Sie haben die Funktion, Leukozyten anzulocken und zu aktivieren. Aufgrund dieser Eigenschaft spielen sie eine wichtige Rolle als Mediatoren bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenwanderung und dadurch ausgelösten Entzündungsprozessen. Die Einwanderung der Leukozyten in ein Entzündungsgebiet wird durch Chemokin-Gradienten gelenkt, die an Moleküle der extrazellulären Matix fixiert sind (Haptotaxis) (Tanaka et al. , 1993). Weiterhin greifen Chemokine direkt in die Adhäsionsvorgänge am Endothel ein und fördern somit die transendotheliale Migration der Leukozyten (Schall et al., 1994; Imhof et al.; 1995).

4.1. Strukturelle und funktionelle Einteilung der Chemokine

Die chemotaktisch wirkenden Zytokine werden aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten in der Familie der Chemokine zusammengefaßt. Charakteristisch sind vier konservierte Cysteinreste, die durch die Ausbildung von Disulfidbrücken für die tertiäre Struktur der Chemokine verantwortlich sind. Traditionell werden die Chemokine anhand der Position der ersten beiden Cysteinreste in zwei Subgruppen unterteilt (Baggiolini et al., 1994). Bei den CXC-Chemokinen sind die ersten beiden Cysteinreste durch eine weitere Aminosäure voneinander getrennt. Im Gegensatz dazu folgen die Cysteinreste der CC-Chemokine in der Aminosäuresequenz direkt aufeinander. Es hat sich gezeigt, daß diese strukturelle Einteilung im wesentlichen auch mit dem Wirkungsspektrum der Chemokine bezüglich ihrer biologischen Aktivitäten und der damit verbundenen Zellselektivität übereinstimmt. Die Zielzellen der meisten CXC-Chemokine sind neutrophile Granulozyten. Im Gegensatz dazu wirken die CC-Chemokine überwiegend auf mononukleare Zellen.

Mit der Aufklärung der Bedeutung des ELR-Motivs (Glutaminsäure-Leucin-Arginin) in der Aminosäuresequenz für die Rezeptorselektivität und der vor kurzem erfolgten Klonierung und Charakterisierung weiterer chemotaktischer Proteine muß diese traditionelle Einteilung der Chemokine auf mindestens 5 Subfamilien erweitert werden.

Innerhalb der CXC-Gruppe besitzen die meisten Proteine ein ELR-CXC-Motiv in der aminoterminalen Region (z. B. IL-8, GRO- α). Diese Proteine wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Die chemotaktischen Aktivitäten der CXC-Chemokine ohne ELR-Motiv (z. B. IP-10, Mig) ähneln im Gegensatz dazu eher den CC-Chemokinen (z. B. MCP-1, MIP-1 α , RANTES), die vor allem auf mononukleare Zellen chemotaktisch wirken.

Von der C-Subfamilie ist bisher nur das Lymphotactin als einziger Vertreter bekannt. Das Lymphotactin besitzt hohe Sequenzhomologien zu den CC-Chemokinen, besonders am C-Terminus. Strukturell am auffälligsten ist das Fehlen des ersten und dritten Cysteinrestes und den sich daraus ergebenden Veränderungen. Für das Lymphotactin wurde gezeigt, daß es nur auf Lymphozyten chemotaktisch wirkt (Kelner et al., 1994).

Die vor kurzem klonierten Chemokine Fraktalkine (Bazan et al., 1997) und Neurotactin (Pan et al., 1997) bilden zusammen eine weitere Subfamilie. Charakteristisch ist ein CX₃C-Motiv und die Expression der Chemokindomäne über einen Mucin-ähnlichen, membranverankerten Anteil. Sie kommen als membrangebundene oder lösliche Moleküle vor, die vermutlich unterschiedliche Funktionen besitzen. Das Fraktalkine wird membranständig auf aktivierten Endothelzellen exprimiert. Die lösliche CX₃C-Chemokindomäne wirkt vor allem auf T-Zellen und Monozyten. Im Gegensatz dazu wird das Neurotactin vorwiegend im Gehirn exprimiert. Eine verstärkte Expression findet sich auf aktivierten Mikrogliazellen, was darauf schließen läßt, daß es bei Entzündungsprozessen im ZNS eine Rolle spielt. Seine Chemokindomäne bewirkt eine ausschließliche Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.

Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Unterschiede können die ca. 35 bis heute klonierten und charakterisierten Chemokine in fünf Gruppen unterteilt werden.

Eine Übersicht der Einteilung der Chemokine ist in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Einteilung der Chemokine

Familie	Beispiel	Zielzellen
CC	MCP-1 MIP-1 α	mononukleare Leukozyten
ELR-CXC	IL-8 GRO- α	neutrophile Granulozyten
non-ELR-CXC	IP-10 Mig	mononukleare Leukozyten
C	Lymphotactin	Lymphozyten
CX ₃ C	Fraktalkine Neurotactin	mononukleare Leukozyten neutrophile Granulozyten

Da zur Zeit an der Klonierung und Charakterisierung von weiteren chemotaktischen Proteinen gearbeitet wird, ist damit zu rechnen, daß die Einteilung der Chemokine in den nächsten Jahren noch erweitert werden muß.

4.2. Leukozytenwanderung: Chemokine als Mediatoren

Die koordinierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Leukozyten und ihrer Rezeptoren auf aktivierten Endothelzellen ist einer der ersten Schritte bei der gerichteten Leukozytenwanderung. Die Adhäsion von Leukozyten läuft in drei Stufen ab („three step model“) (Butcher, 1991). Schwache Interaktionen zwischen Selektinen und ihren Carbohydratrezeptoren vermitteln ein Rollen der Leukozyten auf den Endothelzellen („Rolling-Mechanismus“). Eine Aktivierung der Zellen, die z. B. durch fMLP (formyl Met-Leu-Phe) oder Chemokine induziert werden kann, führt zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen der β_2 -Integrinfamilie („Aktivierung“). Die dadurch ausgelöste, verstärkte Adhärenz der Leukozyten auf den Endothelzellen führt anschließend zur Diapedese und der Einwanderung in das Gewebe in Richtung des chemotaktischen Gradienten („Extravasation“).

Bei vielen Vorgängen, die zur Extravasation von Leukozyten führen, spielen Chemokine eine zentrale Rolle. Neben ihrer Bedeutung als potente, chemotaktische Faktoren besitzen Chemokine die Fähigkeit selektiv auf verschiedene Subpopulationen von Leukozyten zu wirken. CXC-Chemokine wirken auf neutrophile Granulozyten, CC-Chemokine auf Monozyten, Lymphozyten (einschließlich NK Zellen), basophile und eosinophile Granulozyten (Schall et al., 1994). Diese Selektivität gegenüber den Zielzellen ist eine wichtige Voraussetzung für die Regulation einer gerichteten, differentiellen Leukozytenwanderung.

Für das CX₃C-Chemokin Fraktalkine konnte gezeigt werden, daß die auf aktivierten Endothelzellen exprimierte Form eine verstärkte Adhärenz der Zielzellen vermittelt (Bazan et al., 1997). Somit ist dieses Chemokine in der Lage, direkt auf den Schritt der Leukozytenextravasation einzuwirken, bei dem die Zelle vom Rollen am Endothel in eine feste Adhäsion überführt wird, der die anschließende Diapedese ins Gewebe folgt.

Weiterhin bewirken Chemokine durch die Bindung an negativ geladene Proteoglykane, wie z.B. Heparin, die Ausbildung immobilisierter chemotaktischer Gradienten (Haptotaxis). Diese Interaktion reguliert auch gleichzeitig die biologischen Aktivitäten der Chemokine. Für IL-8 konnte gezeigt werden, daß eine

Verringerung des Aktivierungszustandes neutrophiler Granulozyten induziert (Webb et al., 1993).

4.3. Charakterisierung der Chemokine

CXC- und CC-Chemokine sind relativ kleine Moleküle, die aus ca. 70-80 Aminosäuren bestehen. Die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten bzw. zweiten und vierten Cysteinrest bestimmt ihre tertiäre Struktur. Die DNA codiert einschließlich einer Signalsequenz von 20-25 Aminosäuren für 92-99 Aminosäuren. Obwohl die Sequenzhomologie zwischen CXC- und CC-Chemokinen mit ca. 20% nur sehr gering ist, deuten Strukturanalysen auf eine ähnliche dreidimensionale Konfiguration der Proteine hin (Gronenborn et al., 1991).

In der Tabelle 4 sind einige der wichtigsten Mitglieder der humanen Chemokine-Subfamilien aufgeführt (Howard et al., 1996)

Tab. 4: Mitglieder der einzelnen Chemokine-Subfamilien.

Chemokine	Abkürzung für	Zielzellen	Referenz
<u>CXC-Chemokine</u>			
<u>ELR-Motiv</u>			
IL-8	Interleukin-8	N, T	Walz et al., 1987
GRO- α	growth-related oncogene	N, T	Richmond et al., 1988
GRO- β		N	Haskill et al., 1990
GRO- γ		N	Haskill et al., 1990
ENA-78	epithelial neutrophil-activating protein-78	N	Walz et al., 1990
NAP-2	neutrophil-activating-	N	Walz et al., 1991

non-ELR-Motiv

IP-10	IFN- γ inducible protein-10	T, NK, K, M	Kaplan et al., 1987
Mig	monokine induced by IFN- γ	T, Ez, M	Farber 1993
PF-4	platelet factor-4	N, Ez, F	Deuel et al., 1977
SDF-1	stromal cell-derived factor-1	B, T, M	Tashiro et al., 1993

CC-Chemokine

MIP-1 α	macrophage inflamma- tory protein	M, T, NK, N, Ba, Eo, Ma, De, B	Wolpe et al., 1988
MIP- β		M, T NK, DZ	Wolpe et al., 1988
MCP-1	monocyte chemo- attractant protein	M, T, , B DZ, NK	Yoshimura et al., 1989
MCP-2		M, T, Eo, Ms	Van Damme et al., 1992
MCP-3		M, T, Ba, Eo, DZ	Van Damme et al., 1992
MCP-4		M, T, Eo	Uguccioni et al., 1996
RANTES	regulated on activation normal T-cell expressed and secreted	M, T, NK, Eo, DZ, Ba	Schall et al., 1988
I-309	Klon-Bezeichnung	M	Miller et al., 1989

C-Chemokine

Ltn	Lymphotactin	T	Kelner et al., 1994
-----	--------------	---	---------------------

CX₃C-Chemokine

Fraktalkine	T, M	Bazan et al., 1997
Neurotactin	N	Pan et al., 1997

Abk.: B = B-Zellen; Ba = basophile Granulozyten; DZ = dendritische Zellen; Eo = eosinophile Granulozyten; Ez = Endothelzellen; F = Fibroblasten; K = Keratinozyten; M = Monozyten; Ma = Mastzellen; N = neutrophile Granulozyten; NK = natürliche Killerzellen; T = T-Zellen

4.4. Proteolytische Prozessierung und Inaktivierung

Chemokine sind gegenüber Denaturierung und inaktivierenden Proteinen wie z. B. Hitze, pH-Wert-Veränderungen, Detergenzien, organischen Lösungsmitteln oder Plasmapeptidasen äußerst resistent. Diese Eigenschaft ist auf die Konformation des nativen Proteins zurückzuführen. Eine Reduktion der Disulfidbrücken und die anschließende Alkylierung der Cysteinreste, wodurch die erneute Ausbildung der tertiären Struktur verhindert wird, machen das IL-8-Molekül jedoch hochempfindlich gegenüber einem proteolytischen Abbau.

Eine weitere typische Eigenschaft der Chemokine ist ihre extrazellulär erfolgende, N-terminale Prozessierung durch zelluläre Proteasen. Durch den schrittweisen Abbau der N-terminalen Sequenz werden verschiedene Derivate generiert, die sich in ihren biologischen Aktivitäten unterscheiden. Für das IL-8-Molekül sind Derivate mit 79, 72, 70 und 69 Aminosäuren in verschiedenen Überständen gefunden worden. Man vermutet in dem N-terminalen, proteolytischen Abbau einen Mechanismus, der eine Verstärkung der Chemokinaktivität bewirkt (Van Damme et al., 1990).

4.5. Chromosomale Lokalisation und Regulation der Genexpression

Die Homologie der „splice junctions“, die Intron/Exon-Struktur, und die Clusterbildung der Chemokingene im Genom lassen vermuten, daß sie sich aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt haben.

Die Gene der CXC-Chemokine sind mit Ausnahme des SDF-1-Gens (Chromosom 1) auf Chromosom 4. α12-21 lokalisiert. PF-4 und PBP besitzen eine 3 Exon / 2

Intron-Struktur. Im Gegensatz dazu bestehen die anderen CXC-Chemokine aus 4 Exons und 3 Introns.

Für die Regulation der Genexpression der CXC-Chemokine sind verschiedene Faktoren verantwortlich. So enthält die Region des IL-8-Gens zwischen den Positionen -425 und -70 bp (Basenpaaren) stromaufwärts vom Transkriptionsstart putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- κ B, NF-IL-6, ein Octamer-bindendes Motiv, AP-1, Glucocorticoidrezeptoren und den IFN-regulatorischen Faktor (Mukaida et al., 1989).

Eine relativ kleine Region (-94 bis -71 bp), welche die NF- κ B- und NF-IL-6-bindenden Sequenzen enthält und die -50 bis -1 bp Region mit der TATA-Box, stellt den minimalen Promotor des IL-8-Gens dar. Diese Enhancerelemente sind für die Induktion der mRNA nach Stimulation mit IL-1, TNF- α oder PHA (Phytohämagglutinin) verantwortlich.

Die Expression der mRNA für IL-8 wird gewebsspezifisch reguliert. So bewirkt z. B. IL-4 eine Inhibition der IL-1- oder LPS-induzierten IL-8-mRNA-Expression in Monozyten, aber nicht in Fibroblasten, Epithel- oder Endothelzellen (Standiford et al., 1990).

Die Gene der CC-Chemokine sind auf Chromosom 17, q11-21 lokalisiert. Sie weisen alle eine Struktur auf, die aus 3 Exons und 2 Introns besteht.

Über die Regulation der CC-Chemokine ist bisher wenig bekannt. Die „upstream region“ enthält oft Bindungsstellen für NF- κ B, NF-IL-6, AP-1 und AP-2 (Timmers et al., 1990).

4.6. Produzenten der Chemokine

1) Monozyten/Makrophagen

Neben vielen Zytokinen und Wachstumsfaktoren produzieren Monozyten auch eine große Menge an CXC- und CC-Chemokinen. Die Chemokinsekretion durch Monozyten läuft gewöhnlich über eine de novo-Proteinsynthese ab und nicht nur einfach über die Freisetzung eventueller intrazellulärer Speicher. Als Induktoren der IL-8-Sekretion wirken neben Endotoxinen (LPS) (Schröder et al., 1987) auch proinflammatorische Substanzen, wie IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-7,

Immunkomplexe. Sogar die Adhärenz an Plastikoberflächen (Kasahara et al., 1991) oder die Änderung des Sauerstoffpartialdruckes können als Trigger für eine IL-8-Sekretion wirken.

MCP-1 wird hauptsächlich durch Monozyten produziert. Die Expression wird stimuliert durch Phytohämagglutinin, LPS, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF oder IFN- γ . Die Regulation der MCP-1-Expression ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Für LPS sind sowohl stimulatorische (Colotta et al., 1991) als auch inhibitorische (Rollins et al., 1989) Effekte beschrieben worden. Im Maussystem konnte gezeigt werden, daß eine Vorbehandlung der Zellen mit IFN- γ eine Reduktion der LPS-induzierten mRNA-Expression bewirkt (Ohmori et al., 1994).

2) Lymphozyten

Lymphozyten produzieren vor allem CC-Chemokine, wie z. B. RANTES, I-309, MIP-1 α und MIP-1 β . Für die Produktion von CXC-Chemokinen sind sie weit weniger bedeutungsvoll als mononukleare Phagozyten.

3) Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten produzieren IL-8 als Antwort auf verschiedene Stimuli wie z. B. LPS, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF oder Adhärenz. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Produktion und Freisetzung von IL-8 nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit klassischen, chemotaktischen Substanzen wie fMLP (f Met-Leu-Phe), PAF, C5a, LTB₄, während der Phagozytose (Bazzoni et al., 1991) oder durch LPS (Pauligk, 1997; Altstaedt et al., 1996). Dadurch sind neutrophile Granulozyten in der Lage, ihre eigene Rekrutierung zu regulieren.

Für eine Produktion von MCP-1 oder anderen CC-Chemokinen durch neutrophile Granulozyten gibt es bisher erst einige Anhaltspunkte (Kasama et al., 1994; Pauligk, 1997).

4) Gewebezellen

CXC- und CC-Chemokine sind in fast allen Geweben induzierbar (Baggiolini et al., 1994). Hierbei sind IL-1 und TNF- α , die besonders bei chronischen Entzündungsreaktionen nachweisbar sind, die besten Induktoren. Die

Anhaltspunkt für eine therapeutische Behandlung bieten, vor allem von chronischen Entzündungsprozessen.

4.7. Biologische Aktivitäten der Chemokine

Das Auslösen von Chemotaxis (Aktivierung des kontraktiven Zytoskeletts), Exozytose (Freisetzung intrazellulärer Granula), erhöhte Rezeptorexpression und verstärkte Adhärenz der Zellen, Bildung von bioaktiven Lipiden (Arachidonsäurestoffwechsel) und die Freisetzung von toxischen Sauerstoffmetaboliten sind charakteristische Aktivitäten der Chemokine. Dadurch können die Chemokine mit den klassischen chemotaktischen Agonisten wie C5a, fMLP, LTB₄ oder PAF in ihrem funktionellen Verhalten verglichen werden.

1) Chemokineffekte auf neutrophile Granulozyten

Die meisten CXC-Chemokine aktivieren neutrophile Granulozyten im gleichen Umfang wie die klassischen chemotaktischen Agonisten. Die Aktivierung findet ihren Ausdruck unter anderem in der Exozytose gespeicherter Granula, einem zytosolischen Ca²⁺-Anstieg, einer gerichteten Migration, der Expression zusätzlicher Oberflächenmarker und der Bildung von Sauerstoffradikalen. Eine Vorinkubation mit TNF-α („Priming-Signal“) führt zu einer signifikanten Verstärkung der Exozytose nach Stimulation mit IL-8 oder NAP-2 (Brandt et al., 1992).

Die in den α-Granula der Thrombozyten gespeicherten CXC-Chemokine (PBP, CTAP III, PF-4) sind gegenüber neutrophilen Granulozyten inaktiv (Walz et al., 1990). PF-4 ist nicht in der Lage, mit den funktionellen CXC-Chemokinrezeptoren zu interagieren, da es kein ELR-Motiv enthält. CTAP III wird erst durch die N-terminale Prozessierung in die aktive Form NAP-2 überführt.

2) Chemokineffekte auf Monozyten

Die CXC-Chemokine IL-8 und GRO-α besitzen keine chemotaktische Wirkung

Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und eine geringe Freisetzung von Sauerstoffradikalen.

Im Gegensatz dazu reagieren Monozyten sehr stark auf CC-Chemokine. MCP-1 (Rollins et al., 1991), RANTES (Schall et al., 1990), I-309 (Miller et al., 1992), MCP-2, MCP-3 und MIP-1 α (Ming Wang et al., 1993) wirken chemotaktisch auf Monozyten. Stimulation von Monozyten mit MCP-1, I-309, RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β führen zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg. MCP-1 induziert weiterhin die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die Expression der β_2 -Integrine CD 11b / CD 18 und CD 11c / CD 18 und die Produktion von IL-1 und IL-6 (Jiang et al., 1992).

3) Chemokineffekte auf Lymphozyten

Die Aktivierung von bestimmten T-Lymphozytensubpopulationen durch IL-8 und andere CXC-Chemokine wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Die CC-Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β sind in die selektive Rekrutierung von T-Lymphozytensubpopulationen involviert. Eine RANTES-Exposition wirkt vor allem auf T-Zellen vom Memorytyp (CD 4 $^+$, CD 45R0) chemotaktisch (Schall et al., 1990). Diese Zellen sind vorstimulierte T-Helferzellen, die in die Induktion einer sekundären Immunantwort eingebunden sind. Die chemotaktische Aktivierung von Lymphozyten durch MIP-1 α und MIP-1 β beschränkt sich auf anti-CD 3 stimulierte Zellen (Taub et al., 1993). Hierbei wurde gezeigt, daß MIP-1 α stärker auf CD 8 $^+$ T-Zellen, MIP-1 β stärker auf CD 4 $^+$ T-Zellen wirkt.

4) nicht-chemotaktische Effekte von Chemokinen

Die CXC-Chemokine IL-8 und GRO- α sind in Kombination mit Wachstumsfaktoren an der Regeneration von Geweben und der Wundheilung beteiligt.

Für IL-8 konnte gezeigt werden, daß es eine Angiogenese in der Rattencornea induziert (Koch et al., 1992). Die Beobachtung, daß PF-4 ein verzögertes Wachstum von Melanomen und Karzinomen in der Maus bewirkt (Maione et al., 1990), ist im Zusammenhang mit der inhibitorischen Wirkung dieses CXC-Chemokins auf die Angiogenese und die Endothelzellproliferation zu sehen.

Die Auswirkung der CC-Chemokine auf Stammzellen von Granulozyten und Monozyten im Knochenmark verdeutlicht die Komplexität dieser Proteine. So bewirken MIP-1 α und MIP-1 β in Kombination mit GM-CSF und CSF-1 eine verstärkte Proliferation von murinen Granulozyten- und Monozytenvorläuferzellen. Gleichzeitig unterdrückt MIP-1 α aber die Proliferation von weniger ausgereiften, IL-3-abhängigen Vorläuferzellen (Stammzellinhibitor) (Sherry et al., 1992).

5) In vivo Effekte der Chemokine

Als kationisches Protein bindet IL-8 an Glycosaminoglykane in der interzellulären Matrix und auf Zellmembranen. Es bleibt so in aktiver Form im Mikroenvironment der Zellen erhalten. Die intradermale Injektion von IL-8 bewirkt eine Plasmaexsudation, die von einer massiven perivaskulären Infiltration begleitet ist. Das Infiltrat besteht ausschließlich aus neutrophilen Granulozyten. Die Infiltration erreicht bereits nach ca. 30 Minuten ein Maximum und bleibt für ca. 8 Stunden bestehen (Foster et al., 1989). Die gleichzeitige Applikation von vasodilatorischen Stoffen, z.B. PGE₂ (Prostaglandin E₂), verstärken diesen Effekt.

Eine intradermale Injektion von MCP-1 ist mit der gleichen Symptomatik verbunden (Zachariae et al., 1990). Das Infiltrat besteht jedoch im Gegensatz zu IL-8 ausschließlich aus mononuklearen Zellen.

4.8. Die Rolle der Chemokine bei Erkrankungen

1) Hauterkrankungen

Psoriasis wurde als erste Erkrankung beschrieben, die mit einer Überproduktion des CXC-Chemokins IL-8 assoziiert ist (Schröder et al., 1992). Die Überproduktion von IL-8 ist verantwortlich für die massive Infiltration von neutrophilen Granulozyten und die damit verbundene Bildung von Mikroabszessen, die für die psoriatische Haut charakteristisch sind. In situ Hybridisierungen haben gezeigt, daß vor allem die Keratinozyten der oberen Hautschichten an der Überproduktion beteiligt sind. Dermale Makrophagen und

ungewöhnlich hohe Mengen an $\text{TNF-}\alpha$ das als Trigger-Signal der IL-8-Expression wirken kann.

2) Rheumatoide Erkrankungen

Die rheumatoide Arthritis ist begleitet von erhöhten IL-8- und MCP-1-Spiegeln in der Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke (Rampart et al., 1992). Die IL-8-Konzentration korreliert mit den Serumtitern der Rheumafaktoren. Für die Überproduktion von IL-8 sind in erster Linie die Zellen des entzündeten Synoviums, aktivierte Chondrozyten, neutrophile Granulozyten und mononukleare Phagozyten verantwortlich.

Die Hauptquelle von MCP-1 sind Makrophagen, die die CC-Chemokine bei rheumatoider Arthritis konstitutiv exprimieren.

3) Lungenerkrankungen

Bei der idiopathischen, pulmonalen Lungenfibrose korreliert die Menge an freigesetztem IL-8 mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolaren Lavage und der Schwere der Erkrankung (Carré et al., 1991).

Als Antwort auf die ebenfalls, im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöhte MCP-1-Produktion, kommt es zur Einwanderung von mononuklearen Phagozyten und damit zu einer erhöhten, lokalen Synthese von Wachstumsfaktoren für mesenchymale Zellen (Antoniades et al., 1992). Diese Wachstumsfaktoren bilden das Ausgangssignal für eine verstärkte Induktion fibrogener Substanzen auf dem Weg zur Lungenfibrose.

Erhöhte IL-8-Spiegel finden sich weiterhin bei akuten Entzündungen der Lunge (Miller et al., 1992), der zystischen Lungenfibrose (Nakamura et al., 1992) und bei allergischen Reaktionen (Asthma) (Marini et al., 1992).

4) Kardiovaskuläre Erkrankungen

Thrombosen sind eine der Hauptursachen für akute Erkrankungen des kardiovaskulären Systems auf der Grundlage arteriosklerotischer Gefäßveränderungen. Die hierbei stattfindende Thrombozytenaktivierung führt zur Freisetzung der in den Granula gespeicherten CXC-Chemokine PBP und CTAP III. Mit Hilfe zellulärer Prozesse wird durch Molekulare Prozessierung

der inaktiven Formen die aktive Form NAP-2 generiert. NAP-2 ist verantwortlich für die massive Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die thrombotische Zone, was nachfolgend wieder zur Rekanalisation der thrombotischen Gefäße führen kann (Walz et al., 1992).

4.9. Chemokinrezeptoren

Chemokine vermitteln ihre Effekte durch die Interaktion mit Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Die Chemokinrezeptoren gehören zur Rhodopsin-Superfamilie G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Charakteristisch für diese Rezeptorfamilie sind sieben transmembrane Domänen und die Kopplung der Signaltransduktion an G-Proteine. Die DNA der Chemokinrezeptoren codiert für 350-375 Aminosäuren. Alle Chemokinrezeptoren besitzen je einen konservierten Cysteinrest in der NH₂-terminalen Region und der 3. extrazellulären Schleife. Die Ausbildung dieser intramolekularen Disulfidbrücke ist wesentlich für die Konformation der Ligandenbindungstasche.

Nach der auf der Gordon-Konferenz über chemotaktische Chemokine von 1996 festgelegten Nomenklatur werden die Chemokinrezeptoren, die CXC-Chemokine binden als CXCR's und die für die CC-Chemokine als CCR's bezeichnet. Bis heute sind 4 CXCR (1 - 4) und 7 CCR (1 - 7) kloniert worden. Auf Leukozyten werden generell mehr als ein Rezeptortyp exprimiert. Weiterhin besitzen fast alle Chemokinrezeptoren eine überlappende Ligandenspezifität.

4.9.1. CXC-Chemokinrezeptoren

Die Rezeptoren dieser Subfamilie zeigen eine Sequenzhomologie von 36-77 % und sind auf dem Chromosom 2, q35 kolokalisiert.

1) CXCR 1

Der CXCR 1 wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten exprimiert. Er bindet spezifisch nur IL-8. Weiterhin exprimierten Monozyten, basophile und

eosinophile Granulozyten diesen Rezeptor. Eine Expression auf T-Zellen konnte bisher nur durch RT-PCR nachgewiesen werden.

2) CXCR 2

Dieser Rezeptor zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie der CXCR 1. Im Gegensatz ist er aber in der Lage, verschiedene CXC-Chemokine mit unterschiedlicher Affinität zu binden. Hierzu zählen neben IL-8 auch GRO- α , - β , - γ , NAP-2 und ENA-78, also alle ELR-CXC-Chemokine.

3) CXCR 3

Der CXCR 3 wird selektiv nur von aktivierten CD 4⁺ und CD 8⁺ T-Zellen exprimiert. Als Liganden konnten bisher nur IP-10 und Mig identifiziert werden.

4) CXCR 4

Der Ligand für diesen Rezeptor ist SDF-1. Weiterhin zeigt der CXCR 4 ein für Chemokinrezeptoren ungewöhnliches Verteilungsmuster. Neben der Expression in Leukozyten findet sich eine hohe Transkriptionsaktivität auch in verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel Herz, Gehirn, Leber oder Darm.

4.9.2. CC-Chemokinrezeptoren

Für die Rezeptoren dieser Familie konnte eine Sequenzhomologie von 46-89 % gezeigt werden. Die Gene von CCR 1 und CCR 2 sind auf Chromosom 3, p21 lokalisiert.

1) CCR 1

Der Rezeptor bindet MIP-1 α und RANTES mit hoher Affinität.

2) CCR 2

Der CCR 2 liegt in zwei unterschiedlichen RNA-Splicingformen, CCR 2a und CCR 2b, vor. Die Splice-Varianten unterscheiden sich in der intrazellulär lokalisierten COOH-terminalen Region, wodurch die Signaltransduktion, nicht

3) CCR 3

CCR 3 oder Eotaxin-Rezeptor ist sehr stark auf eosinophilen Granulozyten exprimiert. Er bindet Eotaxin, RANTES, MCP-3 und MCP-4 mit hoher Affinität. Dieser Rezeptor scheint eine wesentliche Rolle für die Anlockung von Eosinophilen bei allergischen Reaktionen zu spielen.

4) CCR 4

Dieser Rezeptor wurde aus der cDNA-Bank einer humanen basophilen Leukämie-Zelllinie isoliert. Er bindet mit hoher Affinität an die Liganden RANTES, MIP-1 α und MCP-1.

5) CCR 5

Bindungsstudie haben gezeigt, daß dieser Rezeptor die CC-Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β mit hoher Affinität bindet.

Weitere 7-transmembrane Rezeptoren mit großen Homologien zu den Chemokinrezeptoren sind inzwischen kloniert. Diese „orphan-receptors“ konnten allerdings hinsichtlich ihrer Ligandenselektivität noch nicht weiter charakterisiert werden. Hierzu zählen der BLR 1 (Burkitt's lymphoma-derived receptor 1) und MDR 15 (monocyte-derived receptor 15). Bei diesen auf Monozyten, T- und B-Zellen exprimierten Rezeptoren handelt es sich um NH₂-terminale Splice-Varianten. Ein weiterer, noch nicht näher charakterisierter Rezeptor, EBI 1 (Epstein-Barr virus-infected Burkitt's lymphoma), wird ausschließlich auf T- und B-Zellen exprimiert.

Neben dieser Gruppe der „klassischen“ Chemokinrezeptoren existiert eine weitere Subfamilie von Rezeptoren, deren Funktionen vermutlich in keinen direkten Zusammenhang mit der Auslösung der Migration von Zellen zu sehen sind. Zu dieser Gruppe zählen die viruscodierten Chemokinrezeptoren. Bis heute sind zwei Vertreter dieser Klasse bekannt. Der erste Vertreter wird durch den Leserahmen US 28 des Cytomegalie-Virus (CMV US 28) kodiert. Er interagiert ausschließlich mit CC-Chemokinen (MCP-1, RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β). Der andere Vertreter dieser Klasse ist im Genom des Herpes saimiri Virus (HSV ECRF 3)

Einer weiteren Subfamilie ist das Duffy-Blutgruppen-Antigen (DARC) zu zurechnen. DARC ist ein erythrozytärer Rezeptor, der promiskuitiv CXC- und CC-Chemokine binden kann. (Neote et al., 1994) Dieser Rezeptor ist gleichzeitig verantwortlich für die Invasion des Malaria-Erregers *Plasmodium vivax*. Seine physiologische Funktion besteht vermutlich in der Regulation der Chemokinspiegel in der Zirkulation, um eine Desensibilisierung der zirkulierenden Leukozyten zu verhindern.

Besondere Bedeutung erlangten die Chemokinrezeptoren, nachdem ihre Funktion als Corezeptoren der HIV-Infektion aufgeklärt wurde. Bereits seit einigen Jahren war bekannt, daß neben dem CD 4-Molekül ein weiterer Faktor für die Penetration des HIV-Virus vorliegen muß. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Überstände aktivierter CD 8⁺ Zellen Faktoren enthalten, die eine Suppression der HIV-Infektion bewirken (Walker et al., 1988). Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß die CC Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES die inhibierende Wirkung der CD 8⁺ T-Zellen vermitteln (Cocchi et al. 1995). Kurz darauf konnte gezeigt werden, daß der Chemokinrezeptor CXCR 4 als bevorzugter Cofaktor für die Infektion von T-Zell-tropen HIV-Isolaten dient (Feng et al., 1996). Im Gegensatz dazu zeigen Makrophagen-trophe HIV-Stämme eine ausgeprägte Präferenz für den CC-Chemokinrezeptor CCR 5 (Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996). Durch die Bindung der entsprechenden Liganden (SDF-1 bzw. MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) an die spezifischen Rezeptoren wird durch die kompetitive Hemmung die Anlagerung der HIV-Partikel verhindert und somit die Virusinfektion unterdrückt.

Eine Übersicht der Chemokinrezeptoren und ihrer Liganden ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Chemokinrezeptoren und ihre spezifischen Liganden (Baggiolini et al., 1997)

Rezeptoren	Name	alte Nomenklatur	Liganden
CXC-Chemokine	CXCR 1	IL-8R 1 (Typ A)	IL-8
	CXCR 2	IL-8R 2 (Typ B)	IL-8, GRO' s, NAP-2, ENA-78
	CXCR 3	IP-10/MigR	IP-10, Mig
	CXCR 4	LESTR, HUMSTR	SDF-1
CC-Chemokine	CCR 1	RANTES/MIP-1 α R	RANTES, MIP-1 α , MCP-2, -3
	CCR 2a/b	MCP-1R A/B	MCP-1, -2, -3, -4
	CCR 3	EotaxinR, CC CKR 3	Eotaxin, RANTES, MCP-3, -4
	CCR 4	CC-CKR 4	RANTES, MIP-1 α , MCP-1
	CCR 5	CC-CKR 5	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β

5. Zytokine

Zytokine repräsentieren eine Familie sekretorischer Proteine, die regulatorische Signale zwischen den Zellen vermitteln. Sie tragen wesentlich zur Regulation der Effektorphase sowohl der unspezifischen als auch der spezifischen Immunität bei. Man unterscheidet zwischen Monokinen, die von Monozyten und Makrophagen produziert werden und Lymphokinen, die lymphozytären Ursprungs sind. Die Bezeichnung Interleukine wurde ursprünglich eingeführt, um der Hypothese, daß diese Proteine nur von Leukozyten produziert und nur auf andere Leukozyten wirken, Nachdruck zu verleihen.

Obwohl die Familie der Zytokine eine hohe Diversität aufweist, teilen sie doch einige Gemeinsamkeiten (Abbas, 1994):

- 1) Zytokine werden in der Effektorphase der unspezifischen und der spezifischen Immunität produziert und regulieren die Immunantwort
- 2) Die Sekretion der Zytokine ist selbst-limitierend
- 3) Zytokine wirken auf viele verschiedene Zellen (Pleiotropismus)
- 4) Die Effekte der Zytokine sind häufig redundant
- 5) Zytokine beeinflussen die Synthese anderer Zytokine (Zytokinkaskade)
- 6) Zytokine entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf den Zielzellen (autokriner, parakriner oder endokriner Mechanismus)
- 7) Die Bindung der Zytokine an ihren Rezeptor induziert die Neusynthese von mRNA und Proteinen

Im folgenden sollen kurz drei Zytokine beispielhaft dargestellt werden, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

5.1. TNF- α

Der Tumor-Nekrose-Faktor wurde ursprünglich als Faktor beschrieben, der zu hämorrhagischen Nekrosen in Tumoren führt (Carswell et al., 1975).

TNF- α wird überwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet. Der Faktor wird als transmembranes Typ-II-Protein von 25 kD synthetisiert und anschließend proteolytisch gespalten. Die „sezernierte“ Form liegt im Serum als Homotrimer von 51 kD vor. Die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren führt über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- κ B oder AP-1, zu einer gesteigerten Transkriptionsrate der induzierbaren Gene.

Das Spektrum der biologischen Effekte ist abhängig von der Konzentration des induzierten TNF's. Die Auswirkungen reichen von einer lokalen Entzündungsreaktion, über systemische Effekte (wie z. B. Fieber, Akute-Phase-Proteinen) bis hin zum septischen Schock.

Folgende wesentlichen Effekte werden durch die Einwirkung von TNF- α induziert:

- 1) Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen
- 2) Erhöhung der Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen
- 3) Steigerung der antimikrobiellen Aktivitäten
- 4) Induktion der Zytokinsynthese (z. B. IL-1, IL-6 und Chemokinen) in Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen
- 5) Induktion eines IFN-ähnlichen, Virus-protectiven Effekts
- 6) Aktivierung von Hepatozyten (Produktion von Akute-Phase-Proteinen)
- 7) Veränderungen im Gerinnungssystem
- 8) Suppression der Zellteilungen im Knochenmark
- 9) metabolische Veränderungen (Cachexie)

5.2. IL-6

Interleukin 6 ist ein Zytokin von 26 kD, das von vielen verschiedenen Zellen, vor allem Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert wird. Als Stimuli wirken dabei vor allem IL-1, TNF- α und bakterielle Lipoproteine. IL-6 ist ein Zytokin mit pleiotropen Funktionen, es wirkt vor allem als B-Zellen stimulierender Faktor auf die Ausdifferenzierung und die Ig-Sekretion bereits aktivierter B-Zellen. Weiterhin induziert es in Hepatozyten die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen, wodurch die weitere Entzündungsreaktion unterstützt wird. Zusammen mit IL-1 wirkt es mitogen auf T-Zellen (Gemsä, 1997). Im Gegensatz zu TNF- α oder LPS führt es jedoch nur zu einer sehr geringfügigen Gewebsschädigung (Abbas, 1994).

5.3. IL-10

Interleukin 10 ist ein 18 kD großes Protein, daß von CD 4⁺ T-Zellen, aktivierten B-Zellen, aktivierten Makrophagen und einigen nicht-lymphatischen Zellen (z. B. Keratinozyten) produziert wird. Die wesentlichen regulatorischen Effekte des IL-10 sind die Suppression der Zytokinproduktion (z. B. TNF- α , IL-1, Chemokine und IL-12) durch Makrophagen sowie die Inhibition der T-Zellaktivierung durch

Makrophagen (Reduktion der MHC II-Expression und weiterer kostimulatorischer Moleküle (z. B. B7). In der Summe resultiert hieraus eine Inhibition der T-Zell-vermittelten Immunantwort.

Zusätzlich zu diesen inhibitorischen Effekten zeigt IL-10 aber auch stimulatorische Aktivitäten. Es induziert z. B. in humanen aktivierten B-Zellen ein Umschalten auf die Produktion von IgG 4.

6. Influenza A Viren

Klinisch sind die Influenza Viren von großer pathogener Bedeutung. Schon in der Antike wurden Epidemien beobachtet, die retrospektiv Influenza Virus-Infektionen zugeordnet werden können. Doch erst mit der Isolierung dieser Erreger im Jahre 1933 (Smith et al., 1933) wurde es möglich, systematisch die mit diesen Viren assoziierten Erkrankungen zu analysieren. Zweifellos sind Influenza Viren für weltweite Epidemien verantwortlich, wie z. B. die in den Jahren 1918/19 aufgetretene Pandemie, der schätzungsweise 20 bis 30 Millionen Menschen zum Opfer fielen.

6.1. Klassifizierung und Einordnung des Virusstammes A/PR/8

Das Influenza Virus gehört zur Familie der Orthomyxoviridae. In dieser Familie unterscheidet man drei Genera (White und Fenner, 1994):

1) Influenza A- und Influenza B-Viren

Influenza A-Viren werden in verschiedene Subtypen unterteilt, die gleiche Nukleo- und Matrixproteine besitzen, sich aber in den Hämagglutinin- (HA) und/oder Neuraminidaseproteinen (NA) unterscheiden. Bisher sind 14 Subtypen des HA (H1-H14) und 9 des NA (N1-N9) aus Vögeln isoliert worden. Einige dieser in unterschiedlichen Kombinationen auftretenden Subtypen finden sich auch in Säugetieren einschließlich des Menschen. Benannt werden die Subtypen mit der Typenbezeichnung A oder B, der

Spezies aus der die Erstisolation erfolgte, dem Ort der Isolation, der Nummer des Isolates, dem Jahr der Erstisolation und den H und N Subtypen. So wurde das Influenza Virus A/PR/8/34 (H1N1) erstmals 1934 in Puerto Rico aus dem achten Isolat gewonnen. Es besitzt die HA- und NA-Subtypen H1 und N1.

2) Influenza C Viren

3) Thogoto-like Viren (Tick-Borne Orthomyxoviren)

6.2. Struktur und Charakterisierung von Influenza A Viren

Influenza A Viren sind RNA-Viren mit pleomorpher, kugeliger Gestalt, einem Durchmesser von 80-120 nm und helikaler Kapsidsymmetrie. Die Außenhülle des Influenza Virus stammt von der Zellmembran ab und stellt eine bei der Virusreifung von dieser übernommene Lipiddoppelschicht dar. Während die Innenseite der Außenhülle von dem viralen Membran- oder Matrixprotein (M1) gebildet wird, finden sich auf der Oberfläche des Viruspartikels die stachelartig angeordneten Glykoproteine (Spikes, Peplomere) Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Ein weiteres Matrixprotein (M2) bildet eine geringe Anzahl von Poren innerhalb der Außenhülle (Fields et al., 1991).

Influenza A Viren besitzen eine lineare Negativ-Einzelstrang ssRNA, die in acht Segmente unterteilt ist. Jedes der acht Gensegmente ist assoziiert mit einem eigenen Nukleokapsid, das aus dem Nukleoprotein (NP) besteht, und einem RNA-Polymerasekomplex (Transkriptase). Die Segmente kodieren für 10 Proteine. Die beiden kleinsten Segmente 7 und 8 kodieren für jeweils zwei Proteine, die durch alternatives Splicing der mRNA entstehen.

6.3. Funktionen der viralen Proteine

Die 10 Proteine der Influenza A Viren werden eingeteilt in (White und Fenner, 1994):

1) Nukleoproteine

a) Nukleoprotein (NP)

Das NP ist gemeinsam mit dem Matrixprotein das typenspezifische Antigen. Es bildet das Nukleokapsid und bewirkt das Umschalten von der Transkription zur Replikation.

b) Polymerasekomplex (P)

Der Polymerasekomplex besteht aus drei Proteinen: basisches Protein 1 (PB1), basisches Protein 2 (PB2) und dem sauren Protein (PA). Die Polymerase bewirkt sowohl die Transkription als auch die Replikation der viralen RNA. Weiterhin spaltet sie neusynthetisierte zelluläre mRNA's ca. 12 Nukleotide vom 5'-Cap entfernt, um den für die virale mRNA-Synthese notwendigen Primer zu beschaffen („cap-stealing“).

2) Hüllproteine

a) Hämagglutinin (HA)

Das HA liegt als Homotrimer vor. Es erkennt einen sialinsäurehaltigen Rezeptor (N-acetylneuraminsäure). Das HA-Molekül wird posttranslationell nach dem Einbau in die Membran durch Wirtsenzyme in HA1 und HA2 gespalten, die über eine Disulfidbrücke assoziiert bleiben. Die proteolytische Spaltung des HA-Moleküls ist Voraussetzung für die Infektiosität der Viren. Hierdurch kann die Wirtsspezifität der Influenza A-Viren erklärt werden.

b) Neuraminidase (NA)

Die Neuraminidase ist ein Homotetramer. Sie bewirkt eine Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Oligosacchariden auf Zelloberflächen und Glykolipiden. Sie ist dafür verantwortlich, daß Influenza Viren die Schleimschicht auf Epithelzellen durchdringen können. Weiterhin verhindert es die Selbstaggregation von Viruspartikeln und erleichtert die Virusfreisetzung aus infizierten Zellen.

Darüber hinaus tragen die beiden viralen Oberflächenglykoproteine HA und NA die wichtigsten antigenen Determinanten, die die Ausbildung von humoralen und zellulären Immunreaktionen im infizierten Organismus bewirken.

3) Nicht-glykosylierte Proteine

a) Matrixproteine (M)

Die Proteine M1 und M2 sind auf dem bicistronischen Gensegment 7 kodiert. Sie entstehen durch differentielles Splicing durch Wirtsenzyme. Das M1-Protein ist auf der Innenseite der Lipidhülle angelagert. Es reguliert die Ausknospung der Virionen. Das M2-Protein ist ein Transmembranprotein und bildet innerhalb der Membran Ionenkanäle aus. Eine Funktion dieser Ionenkanäle ist bisher noch nicht bekannt.

4) Nichtstruktur-Proteine

a) Nichtstruktur-Proteine

Die genetische Information für die Proteine NS1 und NS2 ist auf Segment 8 lokalisiert. Auch sie entstehen durch differentielles Splicing. Die beiden Proteine werden nicht im Virion gefunden. Ihre genaue Funktion ist bisher noch unklar. Man vermutet, daß NS1 für das Abschalten der Wirtsproteinsynthese verantwortlich ist.

6.4. Vermehrungszyklus von Influenza A-Viren

Die Adsorption der Influenza Viren erfolgt über eine Bindungsstelle im HA1. Diese erkennt sialinsäurehaltige Proteine oder Lipide auf der Zelloberfläche. Nach rezeptorvermittelter Endozytose gelangt das Virus in ein Endolysosom, in dem das Milieu angesäuert wird (pH 5,5). Die dadurch verursachte Konformationsänderung des HA2 führt zur Freilegung unpolarer Aminosäuren am N-Terminus. Nachfolgend können die viralen und zellulären Membranen miteinander verschmelzen. Das Nukleokapsid gelangt daraufhin in das Zytoplasma der Zelle. Unter Mithilfe von M1 wird die virale RNA freigesetzt („uncoating“), indem die

Zusammen mit den Retroviren sind die Orthomyxoviren die einzigen RNA-Viren, deren Transkription und Replikation im Zellkern und nicht im Zytoplasma stattfindet (Fields et al., 1991).

Als Negativstrang RNA-Virus wird die Transkription des Influenza Virus hauptsächlich durch den viralen, RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplex durchgeführt. Allerdings ist er nicht in der Lage, die mRNA-Synthese zu initiieren oder das 5'-Ende von mRNA-Molekülen durch Capping und Methylierung zu modifizieren. Daher benötigt der initiale Schritt der mRNA-Synthese einen Primer in Form eines 5'-Cap Endes. Der virale Polymerasekomplex spaltet diese Struktur von wirtseigener, zellulärer mRNA etwa 12 Nukleotide vom 5'-Cap entfernt ab. Die fertige virale mRNA wird in das Zytoplasma transportiert, wo anschließend an den Ribosomen die Translation erfolgt.

Durch die Menge des vorhandenen Nukleoproteins wird das Umschalten von der Transkription zur Replikation gesteuert. Die ersten Produkte der replikativen RNA-Synthese sind intermediäre, komplementäre Kopien aller viralen RNA-Segmente. Diese Positivstränge unterscheiden sich von den Positivstrangkopien der Transkription (mRNA's) durch die Struktur ihrer Enden. Den Replikationskopien fehlt sowohl das Cap als auch der Poly(A) Schwanz. Sie dienen als Matrizen für die Produktion von Minusstrang-RNA-Segmenten, die identisch sind mit der ursprünglichen viralen RNA (White und Fenner, 1994).

Die Glykoproteine HA und NA werden am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert. Die Glykosylierung findet im Lumen des ER statt und wird im Golgiapparat vervollständigt bzw. modifiziert. Wegen des ständigen Membranflusses werden die Golgivesikel in die Zellmembran eingebaut, so daß sich dort Bereiche der entstehenden Virushülle formen. Die übrigen Virusproteine werden im Zytoplasma an freien Ribosomen hergestellt.

Die Nukleoproteine werden aufgrund basischer Sequenzen („nuclear transport sequence“) in den Zellkern transportiert, und es kommt zum Zusammenbau des Nukleokapsids. An der Innenseite der Plasmamembran lassen sich die Matrixproteine nachweisen, die an die eingelagerten Hämagglutininmoleküle gebunden sind. Sie haben die Funktion, beim Zusammenbau des Virions den

Kontakt zwischen den viralen Glykoproteinen in der Membran und dem Nukleokapsid zu vermitteln.

Um replikationsfähige Virionen zu erhalten, muß sich von jedem der acht Gensegmente je eine Kopie vor der Abschnürung in einem Viruspartikel zusammenlagern. Die Ausknospung der Viruspartikel („budding“) am apikalen Zellpol wird durch die enzymatische Aktivität der Neuraminidase unterstützt (Fields und Knipe, 1991; White und Fenner, 1994).

6.5. Antigendrift und Antigen shift

Influenza Viren des Typs A können wegen ihrer starken antigenen Variabilität immer wieder Epidemien hervorrufen, indem neu auftretende Virustypen auf eine nicht-immune Bevölkerung treffen. Fortwährend kommt es zu kleineren Antigenveränderungen (Antigendrift), die erklärt werden durch Selektion von Punktmutationen im Hämagglutininmolekül unter immunologischem Druck, zumal nur Antikörper gegen das Hämagglutinin einen vollständigen und bleibenden Impfschutz gewährleisten. Diese Punktmutationen können zu einer Veränderung der Epitopregion führen, indem zusätzliche Asparaginreste eingefügt werden. Durch die Anlagerung einer neuen Seitenkette bei der N-Glykosylierung des Asparaginrestes wird die Antikörpererkennungsstelle maskiert. Antikörper gegen Neuraminidase führen nur zu einem partiellen Impfschutz. Die Matrix- und Nukleoproteine sind für die Immunabwehr nicht zugänglich und sind deshalb für einen Impfschutz ohne Bedeutung.

Größere genetische Veränderungen hingegen resultieren aus dem Antigen shift. Mit diesem Begriff bezeichnet man den Austausch von kompletten RNA-Gensegmenten (Reassortment) zwischen verschiedenen Influenzastämmen bei Doppelinfektion einer Zelle. Aufgrund des segmentierten Genoms tritt dieses Ereignis erheblich häufiger auf als eine „klassische“ genetische Rekombination.

6.6. Pathogenese und Klinik der Erkrankung

Die Influenza Virus-Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt über Aerosole. Das Virus kann die Mukosa des gesamten Respirationstraktes infizieren, wo es sich über einen Zeitraum von 4-6 Tagen vermehrt. Das Spektrum der Erkrankung reicht von einer asymptomatischen Infektion bis hin zur primären Viruspneumonie, die zum Tode führen kann (Stuart-Harris, 1961). In der Regel verlaufen Infektionen mit dem Influenza A-Virus bei seronegativen, gesunden Personen entweder subklinisch oder als „Erkältungskrankheiten“ mit den dazugehörigen Allgemeinsymptomen wie Fieber, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen. Bei Kindern werden als Komplikationen häufig Otitis media, Sinusitis oder Tracheitis beobachtet.

Die gefürchteten Pneumonien haben entweder eine rein virale Ätiologie oder sind die Folge einer bakteriellen Superinfektion, da es aufgrund der Zerstörung mukoziliarer Funktionen leicht zu bakteriellen Infektionen kommen kann. Derartige kombinierte viral/bakterielle Pneumonien treten dreimal häufiger auf als reine virale Pneumonien. Die am häufigsten anzutreffenden Bakterien sind *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* (Schwarzmann et al., 1971). Bakteriell sezernierte Proteasen begünstigen die Virusausbreitung durch Spaltung des Hämagglutinins.

Neben dem pulmonalen System können auch innere Organe durch eine Influenza Infektion in Mitleidenschaft gezogen werden. So können Pleuritis, Myokarditis, Myositis, Meningitis und sogar Embryopathien verursacht werden.

Bisher sind nur akute Infektionen beobachtet worden. Für eine Persistenz von Influenza A Viren gibt es keine Hinweise.

7. Interaktion von Viren mit mononuklearen Zellen

Mononukleare Zellen sind wesentlich in die unspezifische Immunabwehr eines Organismus gegen virale Infektionen einbezogen. Generell unterscheidet man bei den Reaktionen von mononuklearen Phagozyten gegenüber Virusinfektion zwei Kategorien: eine „virusunspezifische, intrinsische Aktivität“ gegen intrazelluläre

Viren nach Infektion oder Phagozytose und eine „extrinsische Aktivität“ gegen extrazelluläre Viren oder andere virusinfizierte Zellen (Stohlman et al., 1982; Morahan et al., 1985).

Extrinsische Interaktionen umfassen die extrazelluläre Inaktivierung von Viren sowie die Unterdrückung der Virusvermehrung in anderen Zelltypen. Sie bestehen beispielsweise darin, infizierte Zellen vor der Freisetzung infektiöser Viren zu lysieren, die Virusreifung zu verhindern, extrazelluläre Viren durch Enzyme oder Sauerstoffmetabolite zu inaktivieren oder Interferone freizusetzen.

Intrinsische Aktivität bedeutet, daß mononukleare Phagozyten zwar im allgemeinen infizierbar sind, es jedoch zu keiner nennenswerten Virusvermehrung kommt. Diese Form der Interaktion ist bisher allerdings nur wenig erforscht.

Die antivirale Wirkung von Makrophagen kann indirekt durch Lymphozyten, Antikörper, Komplement oder Lymphokine modifiziert werden. Die Hemmung der Virusreplikation durch extrinsische Resistenzmechanismen der Makrophagen wurden beispielsweise für HSV (Herpes Simplex Virus), CMV (Cytomegalie Virus) und VSV (Vesikuläre Stomatitis Virus) beschrieben (Morahan et al., 1984; Stohlman et al., 1982; Rager-Zisman et al., 1982). Dagegen ist eine lytische Infektion dieser Zellen eher die Ausnahme. Im Hinblick auf den Differenzierungsgrad von Makrophagenkulturen wurde festgestellt, daß in vitro gealterte Makrophagen offensichtlich permissiver für bestimmte Viren, wie zum Beispiel HSV, sind (Görtz et al., 1984). Einige Viren (z.B. Sendavirus) können mononukleare Phagozyten persistent infizieren ohne Ausprägung von zellulären zytopathischen Veränderungen (Mills, 1979). Dadurch werden Zellen, die eigentlich wesentlich in die unspezifische Immunabwehr eines Organismus einbezogen sind, zum Virusreservoir und können indirekt die Ausbreitung der Krankheitserreger im Körper fördern. Virusinfektionen können bei Makrophagen ein breites Spektrum an funktionellen Veränderungen bewirken (Whitton et al., 1990). Dazu zählen unter anderem die Beeinträchtigung der Chemotaxis, der Antigenpräsentation, der Zelldifferenzierung, der Phagozytose und der DNA-Synthese. Aber auch metabolische Veränderungen, die die Synthese und Freisetzung von Prostaglandinen, Proteasen, Komplementfaktoren und Zytokinen beeinflussen können, wurden beobachtet (Morahan et al., 1985; McChesney et al., 1987)

7.1. Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und Makrophagen

Influenza Viren können die Phagozytosefähigkeit von infizierten Makrophagen unterschiedlich beeinflussen. Diese Viren infizieren abortiv murine Alveolarmakrophagen und Peritoneal-makrophagen in vitro, ohne die Phagozytosefunktion zu beeinträchtigen (Nugent et al., 1979; Rodgers et al., 1981). Im Gegensatz dazu wurden bei in vivo Infektionen muriner Makrophagen Einschränkungen der Phagozytosefähigkeit gefunden (Jakab et al., 1980). Die Aktivierung von Peritonealmakrophagen durch Interferon bewirkte eine effektive Lyse virusinfizierter Zielzellen (Mak et al., 1984).

Im humanen System sind ebenfalls Beeinträchtigungen verschiedener Effektorleistungen festgestellt worden. Die Infektion humaner Monozyten verminderte ihre chemotaktische Reaktion, ihre Phagozytose und ihre Fähigkeit zur intrazellulären Abtötung von *Candida albicans*, während die Zelladhäsion unbeeinflusst blieb (Gardner et al., 1982). Lösliche Faktoren von infizierten humanen Alveolarmakrophagen werden für die Entstehung von Lungenfibrosen nach einer langen, Influenza Virus-bedingten Alveolitis verantwortlich gemacht (Jennings et al., 1984). Bakterielle Superinfektionen induzieren durch Endotoxinfreisetzung TNF- α (Nain et al., 1990). Vermutlich ist TNF- α als Mediator der Fibrose von Bedeutung.

7.2. Zytokinmuster Influenza A/PR/8 infizierter mononuklearer Phagozyten

Viele Zytokine aktivieren Monozyten und Makrophagen. Diese Funktion ist bei der Verteidigung des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen von essentieller Bedeutung. Mittlerweile ist auch bei einigen Viren gefunden worden, daß sie die Zytokinproduktion stimulieren. Die virusinduzierte Zytokinsynthese spielt eine wichtige Rolle bei akuter und chronischer Entzündung sowie bei der Initiation von virusspezifischen Lymphozytenantworten.

Folgende Zytokine werden beispielsweise bei viraler Infektion von Monozyten oder Makrophagen freigesetzt: TNF- α , IL-1, IL-6 und CC-Chemokine (Aderka et al., 1986; Wright et al., 1988; Nain et al., 1990; Sprenger et al., 1996). Jedoch ist bisher über die exakten Mechanismen, die die Transkription der Zytokingene anschalten, noch sehr wenig bekannt. Abgesehen von HIV (Leung et al., 1988; Griffin et al., 1989) hat man bisher kaum Hinweise auf virusinduzierbare Transkriptionsfaktoren oder sogenannte „virus responsive elements“ in den flankierenden Regionen der Zytokingene gefunden (Goldfeld et al., 1989; Goldfeld et al., 1990 und 1991).

Humane Monozyten, Alveolarmakrophagen aus Ratten und murine Makrophagen sind empfänglich für eine Influenza A-Infektion. Schon innerhalb eines Tages nach der Infektion mit 2 MOI (multiplicity of infection) A/PR/8 sterben in vitro etwa 50 % der humanen Monozyten (Bender et al., 1993). A/PR/8 infiziert diese Zellen nicht abortiv, sondern sogar geringgradig produktiv (Nain et al., 1990).

Eine Infektion von humanen Monozyten mit A/PR/8 stimuliert die Expression einer Reihe von Zytokinen. Das Virus induziert die Freisetzung von IFN- α und aktiviert die TNF- α -, IL-1 β - und IL-6-Gentranskription. Die Akkumulation der mRNA der zuletzt genannten drei Zytokine kann noch verstärkt werden durch Kostimulation der Zellen mit LPS und GM-CSF. Außerdem triggert die Kombination beider Stimuli eine effiziente Translation und Freisetzung der biologisch aktiven Proteine (Bender et al., 1993).

In den letzten Jahren konzentrierten sich die meisten Studien über A/PR/8 bedingte Veränderungen der Zytokinexpression in Monozyten und Makrophagen auf TNF- α . Übereinstimmungen zwischen klinischen Symptomen einer Influenza A-Infektion und Wirkungen von TNF- α lassen eine Bedeutung dieses Proteins bei der viralen Infektion vermuten. Verschiedene Typen von mononuklearen Phagozyten einschließlich der Monozyten antworten innerhalb von 3 bis 9 Stunden nach einer Influenza A-Infektion mit starker TNF- α mRNA-Akkumulation. Die mRNA-Akkumulation ist aber von einer nur geringen TNF- α -Produktion begleitet. Vermutlich aktiviert eine Influenza A-Infektion die Makrophagen erst bei

Einwirkung von sekundären, triggernden Signalen, wie z. B. LPS zu einer starken TNF- α -Freisetzung (Gong et al., 1991; Sprenger et al., 1994).

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß A/PR/8 in humanen Monozyten eine verstärkte Expression der auf mononukleäre Zellen wirkenden CC-Chemokine induziert. Im Gegensatz dazu wurden jedoch die auf neutrophile Granulozyten wirkenden Chemokine IL-8 und GRO- α durch das Influenza A Virus deutlich supprimiert (Sprenger et al., 1996). Die diesem Phänomen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind allerdings noch ungeklärt.

8. Bakterielle Moduline

Endotoxine und andere bakterielle Komponenten sind in der Lage, durch die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1, IL-6 und TNF- α) pathophysiologische Veränderungen in einem Organismus zu bewirken. Unter dem Begriff Moduline werden diese verschiedenen Virulenzfaktoren zusammengefaßt (Henderson et al., 1996). Hierzu zählen neben den Endotoxinen weitere bakterielle Produkte, wie Proteine, Lipide oder Zuckermoleküle. Diese Moduline sind in der Lage, durch die Modulation der Zellaktivität Veränderungen zu induzieren, und somit das normale, homeostatische Gleichgewicht des Zytokinnetzwerkes negativ zu beeinflussen. Die Auswirkungen dieser Interaktionen reichen über die Induktion einer lokalen Immunantwort und pathologische, chronischen Infektionen bis hin zur Auslösung eines in vielen Fällen letalen, septischen Schocks.

Im folgenden werden Struktur und Funktion einiger Moduline vorgestellt, deren Auswirkungen auf die Zytokin- und Chemokinfreisetzung durch Monozyten und Makrophagen in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

8.1. LPS

Lipopolysaccharide sind ein integraler Bestandteil der äußeren Membran der Zellhülle von vielen gramnegativen Bakterien. Die Bezeichnungen LPS und Endotoxin werden häufig als Synonyme benutzt. Hierbei bedeutet die Vorsilbe Endo-, daß es sich bei diesen Molekülen um integrale Bestandteile der Bakterienzelle handelt, die in der Regel erst frei werden, wenn die Bakterienzelle zerfällt. Um eine Vereinheitlichung der Nomenklatur zu erhalten, sollte die Bezeichnung LPS für aufgereinigte bakterielle Extrakte, die keine nachweisbaren Kontaminationen, wie z. B. Proteine enthalten, vorbehalten werden. Im Gegensatz dazu sollte die Bezeichnung Endotoxin für Extraktionsprodukte, die makromolekulare Komplexe aus LPS, Proteine und Phospholipide enthalten, verwendet werden (Hitchcock et al., 1986).

Der chemische Aufbau der Lipopolysaccharide ist gut untersucht. Es lassen sich drei makromolekulare Anteile voneinander unterscheiden, die man, von außen nach innen, als Region I bis III, bzw. als O-Antigen, als Kernpolysaccharid und als Lipid A bezeichnet (Hahn et al., 1991).

1) O-Antigene der LPS

Die O-Antigene bestehen meistens aus Einheiten von drei bis maximal 20 Hexosemolekülen. Diese weisen zum Teil eine Struktur auf, die nur bei besonderen Bakterienspezies vorkommt. Sie liegen der Oberfläche der äußeren Membran als Knäuel auf und bedingen die Oberflächen-Hydrophilie der Bakterienzelle. Die O-Antigene sind für die Bildung hochspezifischer Antikörper verantwortlich.

Die Bedeutung der O-Antigene und ihre Rolle bei der Zytokin-induzierenden Aktivität durch LPS ist noch weitestgehend unklar. Für eine Induktion der IL-1-Synthese in Monozyten und Makrophagen scheinen sie nicht essentiell zu sein. Ihre Bedeutung für die Induktion von TNF- α in PBMC's wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Feist et al., 1998; Männel et al., 1989)

2) Kernpolysaccharid der LPS

Das Kernpolysaccharid besteht aus zwei Untereinheiten, dem inneren und dem

N-acetyl-Glucosamin auf. Das innere Kernpolysaccharid weist als Besonderheit zwei ungewöhnliche Zucker, Heptose und Keto-desoxy-oktonat (KDO) auf. Das Kernpolysaccharid ist, im Gegensatz zu den O-Antigen-Seitenketten, bei vielen gramnegativen Bakterien weitgehend gleichartig aufgebaut. Es ist über das KDO mit dem Lipidanteil des LPS, dem Lipid A, verbunden.

Für die biologischen Aktivitäten des Lipid A-Anteils scheint das KDO des inneren Kernpolysaccharids von entscheidender Bedeutung zu sein. Es konnte gezeigt werden, daß für eine erfolgreiche Induktion der IL-1-Synthese in Monozyten durch LPS mindestens ein KDO-Rest an dem Lipid A-Anteil vorhanden sein muß (Cavaillon et al., 1990).

3) Lipid A des LPS

Das Lipid A ist für die meisten pathophysiologischen Wirkungen der LPS verantwortlich. Es bildet den „Membrananker“ des LPS und trägt zu der Funktion der äußeren Membran als Permeationsbarriere entscheidend bei. Das Lipid A ist ein amphiphiles Molekül. Die hydrophile Kopfgruppe besteht aus zwei β -1-6-glykosidisch verknüpften N-acetyl-Glucosamin-Molekülen, die zusätzlich zumindest mit zwei Phosphatresten und ggf. weiteren polaren Gruppen, wie z. B. Ethanolamin, enthalten. Vier Hydroxy-Fettsäureketten sind als hydrophober Anteil mit der Kopfgruppe verbunden. Typisch ist die Substitution von einigen Hydroxy-Fettsäuren, so daß auf ein Molekül Lipid A insgesamt 6-7 Fettsäurereste entfallen. Die Lipid A-Moleküle von verschiedenen Bakterien unterscheiden sich hinsichtlich der Zuckerreste, der verwendeten Fettsäuren, der Anzahl und Lokalisation der Acylreste, dem Grad der Phosphorylierung und den Substituenten an den Phosphatgruppen.

Als ein möglicher Rezeptor, der die Wirkungen des LPS auf Monozyten und Makrophagen vermittelt, wird zur Zeit das CD 14-Molekül diskutiert. Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß LPS im Serum zunächst von LBP (LPS-bindendes Protein) gebunden wird (Tobias et al., 1986). Dieser Komplex interagiert anschließend mit dem CD 14-Molekül. Da das CD 14-Molekül ein GPI-verankertes Membranprotein ist, ist es somit nicht selbst in der Lage, die für die Zellaktivierung notwendigen intrazellulären Signale zu vermitteln. Zur Zeit

wird deshalb davon ausgegangen, daß das CD 14-Molekül nur ein Teil eines großen, aus mehreren Molekülen bestehenden Rezeptorkomplexes ist.

Als weitere mögliche LPS-Rezeptoren wurden die Adhäsionsmoleküle der β_2 -Integrinfamilie (CD 18 / CD 11a, CD 18 / CD 11b und CD 18 / CD 11c) beschrieben (Wright et al., 1986). Es konnte gezeigt werden, daß diese Moleküle LPS binden können und in Transfektionsexperimenten in der Lage waren, eine zelluläre Antwort zu induzieren. Auch für andere membranständige Proteine konnte aufgezeigt werden, daß sie LPS binden können (Ulevitch, 1993). Die Funktion dieser Proteine als LPS-Rezeptoren wurde allerdings nicht weiter untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen muß die Möglichkeit diskutiert werden, daß es sich bei dem eigentlichen LPS-Rezeptor um ein multimeres Molekül, einem aus mehreren Rezeptoren bestehenden Komplex oder um grundsätzlich verschiedene Rezeptoren handelt, die unterschiedliche Formen von LPS erkennen.

8.2. MALP-2

Mykoplasmen sind Bakterien, für die das Fehlen einer Zellwand charakteristisch ist. Wegen der fehlenden Zellwand färben sich Mykoplasmen nicht nach Gram. Sie sind die kleinsten Lebewesen überhaupt, die außerhalb von Zellen vermehrungsfähig sind. Da Mykoplasmen eine Reihe von Stoffwechselreaktionen nicht durchführen können, sind sie darauf angewiesen, als extrazelluläre Parasiten auf den Schleimhäuten ihrer Wirtsorganismen zu wachsen (Hahn et al., 1991). In der Pathogenese sind akute Mykoplasmeninfektionen bedeutungslos, da sie häufig relativ problemlos verlaufen. In der Literatur wird allerdings die Entstehung von chronischen Entzündungen, wie z. B. der rheumatischen Arthritis durch persistierende Mykoplasmeninfektionen diskutiert (Cole et al., 1985; Barile et al., 1991). Weiterhin sollen Mykoplasmen eine Rolle bei der Pathogenese von AIDS spielen (Lo et al., 1991). In Zellkulturen können Mykoplasmen als störende Kontamination vorhanden sein, die eine Aktivierung der Zellen, besonders von immunregulatorischen Zellen, bewirken.

Das Makrophagen-aktivierende Protein-2 wurde aus *Mycoplasma fermentans*

mit einem Molekulargewicht von 2163,3 D. Die Strukturanalyse ergab folgenden chemischen Aufbau: S-(2,3-bisacyloxypropyl) Cystein-GNNDESNISFKEK mit zwei über Esterbindungen verknüpften Fettsäureresten pro Molekül. Als weitere besondere strukturelle Eigenschaft besitzt das MALP-2-Molekül einen freien NH₂-Terminus.

8.3. OspA

Das „outer surface protein A“ wurde aus *Borrelia burgdorferi* isoliert und aufgereinigt. *Borrelia burgdorferi* gehört zur Familie der Spirocheten und ist verantwortlich für das Krankheitsbild der Lyme-Disease. Dieses ist charakterisiert durch eine starke systemische Entzündungsreaktion und die Persistenz des Erregers.

Für die Entstehung der systemischen Entzündungsreaktion ist vermutlich das OspA-Molekül verantwortlich. Wie von einigen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, ist das Lipoprotein OspA in der Lage, in verschiedenen Zelltypen eine Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zu bewirken.

8.4. LTA

Die Lipoteichonsäuren sind anionische Polymere, die in der Zellwand von grampositiven Bakterien vorkommen. Sie sind über Glykolipide oder Diglyceride in der Außenseite der Zytoplasmamembran verankert und erreichen durch die Zellwand hindurch die Zelloberfläche (Hahn et al., 1991). Chemisch gesehen bestehen die amphipathischen Lipoteichonsäuren aus Polyglycerolphosphatketten mit D-Alaninen und verschiedenen Zuckersubstituenten. Die Lipoteichonsäuren können als grampositives Äquivalent der Lipopolysaccharide der gramnegativen Bakterien gesehen werden. Es wird vermutet, daß sie durch ihre Zytokin-induzierenden Eigenschaften wesentlich zum Schocksyndrom in Patienten mit einer grampositiven Sepsis beitragen (Henderson et al., 1996).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde bereits gezeigt, daß einige LTA´s in der

IL-6 und der Chemokine IL-8 und MIP-1 α in Monozyten und Makrophagen zu induzieren (Mattsson et al., 1993; Riesenfeld-Orn et al., 1989; Danforth et al., 1995; Standiford et al., 1993). Allerdings haben vergleichende Studien ergeben, daß die LTA's von verschiedenen grampositiven Bakterienspezies große Unterschiede in ihrer Fähigkeit zeigen, die Zytokinsynthese zu stimulieren (Bhakdi et al., 1991). Übereinstimmend konnte gezeigt werden, daß eine Deacylierung der LTAs zu einem Verlust ihrer Zytokin-induzierenden Wirkung führt.

Die induzierende Wirkung der LTA's ist durch eine Blockade des CD 14-Moleküls nicht inhibierbar (Heumann et al., 1994). Aus dieser Beobachtung ist zu schließen, daß der zelluläre Rezeptor für die LTA's nicht mit dem LPS-Rezeptor identisch ist. Ein spezifischer Rezeptor der die Zytokin-induzierenden Effekte der LTA's vermittelt, konnte bisher noch nicht charakterisiert werden.

9. Zielsetzung

Das immunhistologische Bild einer akuten Entzündungsreaktion ist charakterisiert durch die massive Einwanderung von immunregulatorischen Zellen, wie z. B. Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten. Wie vor kurzem gezeigt werden konnte, ist für diese Immigration die Induktion von Chemokinen verantwortlich, die gezielt leukozytäre Zellen chemotaktisch anlocken und aktivieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, chemotaktische Aktivitäten zu charakterisieren, die durch bakterielle und virale Infektionen induziert werden. Zunächst sollten diese Aktivitäten auf funktioneller und proteinbiochemischer Ebene analysiert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Reexposition von humanen Monozyten die Chemokin-induzierenden Eigenschaften von bakteriellen Modulinen verändert. Von besonderem Interesse war hierbei die Fragestellung, ob durch eine selektive Suppression von Chemokinen eine dauerhafte Persistenz einiger Krankheitserreger erklärt werden kann.

Im Gegensatz dazu ist das immunhistologische Bild einer Influenza A-Virus-Infektion geprägt durch die ausschließliche Einwanderung von mononukleären Zellen wie Monozyten und Lymphozyten. Wie vor kurzem gezeigt werden konnte, ist für diesen Mechanismus die selektive Induktion von Chemokinen verantwortlich, die gezielt mononukleäre Zellen anlocken,.

In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob durch den Einsatz definierter Influenza A-Virusbestandteile die beobachtete selektive mRNA- und Proteinexpression induzierbar, oder ob die Infektiosität des Virus von entscheidender Bedeutung ist. Hierfür wurden nicht-infektiöse Virosomen präpariert und für die Stimulation von humanen Monozyten eingesetzt. Virosomen enthalten nur die in die Hüllmembran in ihrer natürlichen dreidimensionalen Struktur eingelagerten HA- und NA-Moleküle.

Als ein weiterer Schwerpunkt sollte in dieser Arbeit die Veränderung der Chemokinrezeptorexpression nach Aktivierung von Monozyten untersucht werden. Besonders Interesse galt hierbei der Fragestellung, ob Monozyten

(A/PR/8) oder Behandlung mit bakteriellen Stimuli (LPS) noch chemotaktische Eigenschaften besitzen. Zusätzlich sollte die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche der stimulierten Monozyten analysiert werden.

II. Material und Methoden

1. Medien, Zellen und Virusstamm

1.1. Medien

Soweit nicht besonders vermerkt, wurde in allen Versuchen das Zellkulturmedium RPMI 1640 verwendet, welches mit den nachfolgend aufgeführten Lösungen Glutamin (Endkonzentration 2 mM), HEPES (Endkonzentration 50 mM), nichtessentielle Aminosäuren (Endkonzentration 1 %), Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 50 U/ml bzw. 50 mg/ml) und Pyruvat (Endkonzentration 2 mM) zu RPMI 1640^{sup} vervollständigt wurde.

1.2. Zellen

1.2.1. Primäre Zellen

Die Präparation und Isolation humaner Monozyten und neutrophiler Granulozyten erfolgte aus frischem Venenblut gesunder Blutspender, das freundlicherweise von Prof. Dr. V. Kretschmer, Zentrum für Transfusionsmedizin der Universitätsblutbank Marburg, zur Verfügung gestellt wurde.

1.2.2. Zelllinien

1.2.2.1. Mono Mac 6 Zellen

Die humane monozytäre Suspensionszelllinie Mono Mac 6 wurde 1985 aus dem Blut eines männlichen Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert. Mono

Mac 6 Zellen exprimieren im Gegensatz zu den monoblastischen Zelllinien U937 und THP-1 konstitutiv phänotypische und funktionelle Merkmale reifer Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al., 1988). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock, Institut für Immunologie, Universität München, zur Verfügung gestellt.

Als Grundmedium für diese Zellen diente RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) mit 10% FCS (Biochrom, Berlin). Ihm wurden im Verhältnis 1:100 (v/v) folgende Zusätze hinzugefügt:

L-Glutamin (200 mM)	(Gibco, Eggenstein)
HEPES-Pufferlösung (1 M)	(Biochrom, Berlin)
Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10000mg/ml)	(Biochrom, Berlin)
nicht-essentielle Aminosäuren	(Biochrom, Berlin)
OPI (150 mg Oxalacetat; 50 mg Natriumpyruvat; 8,2 mg Insulin), in 10 ml Zellkulturwasser	(Gibco, Eggenstein)

Für die Kultivierung der Mono Mac 6 Zellen wurden ausschließlich 24-Loch-Platten der Firma Costar (Bodenheim, Nummer 163160) verwendet. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich durch Resuspendieren geerntet und anschließend bei Raumtemperatur und 400 x g für 7 min abzentrifugiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden sie in neuem Medium auf 1×10^7 Zellen/50 ml eingestellt und mit 2 ml Zellsuspension/Vertiefung auf die Platten verteilt. Die Kultivierung erfolgte unter den angegebenen Standardbedingungen.

1.2.2.2. THP-1 Zellen

Die THP-1 Zellen wurden aus dem peripheren Blut männlichen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie isoliert. THP-1 Zellen exprimieren Fc- und C3b-Rezeptoren. Die Zellen produzieren Lysozym und sind in der Lage, Latexpartikel und sensibilisierte Erythrozyten zu phagozytieren. Die Zellen enthalten unspezifische Esterase als weiteren monozytenspezifischen Marker. Durch Stimulation der THP-1 Zellen kann die Differenzierung in Makrophagen-ähnliche Zellen induziert werden.

Die THP-1 Zellen wurden in RPMI^{sup} + 5% FCS in Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen durch Resuspendieren geerntet und bei Raumtemperatur und 400 x g für 7 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in neuem Medium resuspendiert und im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 subkultiviert.

1.2.2.3. MDCK II Zellen

MDCK II Zellen (Madin and Darby Canine Kidney) wurden 1958 von Mardin und Darby aus dem Nierenepithel eines Cocker-Spaniels isoliert (Fuller et al., 1984). Diese adhären-wachsende Zelllinie wurde zur Titerbestimmung des Influenza A Virus und der Virosomen eingesetzt.

Als Grundmedium für die Kultivierung der MDCK II Zellen diente MEM (Minimum Essential Medium)-EARLE mit 2,2 g/l NaHCO₃, ohne L-Glutamin (Biochrom, Berlin). Dieses wurde mit 10% FCS und den fünf Supplementen, die auch in dem Monozytenmedium enthalten waren, ergänzt (siehe Materiel und Methoden 1.1.: Medien). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen. Alle 3 bis 4 Tage wurden sie im Verhältnis 1:3 bis 1:10 umgesetzt. Für die Subkultivierung wurde das verbrauchte Medium dekantiert und der Monolayer mit PBS^{def} gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung A; Gibco, Eggenstein) auf den Zellrasen gegeben, in der Flasche verteilt und sofort wieder dekantiert. Sobald sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen ließen, wurden 5-10 ml Medium mit 10% FCS zupipettiert, um das Trypsin zu inaktivieren. Anschließend wurden die Zellen gründlich resuspendiert und wie erwähnt subkultiviert.

Die Zellkulturen wurden als offenes System in Brutschränken der Firma Heraeus (CO₂-Auto-Zero, bzw. Cytoperm) bei 37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre inkubiert (Standardbedingungen). Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilbank (LaminAir, HLB 2448; Heraeus, Osterode) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurden alle

Tuttlingen) ausgeführt. Alle in der Zellkultur verwendeten Substanzen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen- und Endotoxinkontaminationen überprüft (siehe Material und Methoden: 1.2.3. Testsysteme zur Kultivierung der Zellen). Kontaminierte Reagenzien und Zellen wurden verworfen.

1.2.3. Testsysteme zur Kultivierung der Zellen

1.2.3.1. Überprüfung der Zellkulturen auf Mykoplasmen

Als Kontaminationen von Zellkulturen führen Mykoplasmen zu einer allgemeinen Aktivierung und der damit verbundenen Mediatorenfreisetzung aus Monozyten/Makrophagen. Deshalb wurden alle Zellkulturen auf mögliche Mykoplasmenkontaminationen untersucht, um eine unspezifische Aktivierung der Zellen zu vermeiden.

Für den Nachweis einer Mykoplasmeninfektion wurde der Mykoplasma Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) verwendet. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Plattenphotometers (MR 7000; Dynatech, Denkendorf).

1.2.3.2. LAL-Test zum Ausschluß von Endotoxinkontaminationen

Um eine unspezifische Aktivierung der Monozyten durch Endotoxinkontaminationen zu verhindern, wurden alle für die Zellkulturen verwendeten Medien, Seren, Virussuspensionen und Reagenzien mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Limulus-Amöbocyten-Lysat-Tests (Whittaker, Walkersville, UK) auf ihren Endotoxingehalt überprüft. Die dabei ermittelten Werte von Endotoxin lagen unterhalb der Nachweisgrenze ($< 0,1$ EU/ml), so daß eine unspezifische Stimulation der Zellen ausgeschlossen werden konnte.

1.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Alle Zellzählungen wurden in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Zur Ermittlung des Mittelwertes wurden jeweils vier Eckquadrate ausgezählt. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl im Eckquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

1.2.5. Überprüfung der Zellvitalität

1.2.5.1. Trypanblau-Färbung

Die Trypanblau-Färbung erlaubt eine Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen. Während sich der Farbstoff in toten Zellen anreichert (Blaufärbung), sind vitale Zellen (ungefärbt) in der Lage, den eingedrungenen Farbstoff aktiv aus dem Zytoplasma zu entfernen (Trypanblau-Ausschluß).

Die präparierten neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten wurden auf ihre Vitalität überprüft, indem ein Aliquot der Zellpräparation 1:2 mit 0,25 % Trypanblau-Lösung (Serva, Heidelberg) verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde der Anteil gefärbter und damit toter Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt.

1.2.5.2. Messung der Stoffwechselaktivität von Zellen mit MTT

Das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird in lebenden Zellen durch die enzymatischen Aktivitäten mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem dunkelblauen, wasserunlöslichen Formazanderivat reduziert (Herrmann, 1960). Die optische Dichte des blauen Farbstoffes ist dabei direkt proportional zur Anzahl der Zellen und korreliert mit deren Stoffwechselaktivität (Mosmann, 1983). Der MTT-Test wurde deshalb zur

Verfahren wurde gewählt, um die zytopathischen Effekte der Influenza A-Viren auf die infizierten Monozyten nachzuweisen.

Nach der Abnahme der Überstände wurden in die Vertiefungen je 250 µl RPMI^{sup} und 25 µl MTT-Lösung (Konzentration 5 mg/ml in PBS^{def}) (Sigma, St. Louis, MO, USA) pipettiert. Für die enzymatische Reaktion wurden die Zellen 2-4 Stunden bei 37° C unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Lyse der Zellen und zum Lösen des Farbstoffes wurden anschließend 250 µl einer 20 %igen SDS-DMF-Lösung (20 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml 50 %igem N,N-Dimethylformamid) (Serva, Heidelberg bzw. Merck, Darmstadt) pipettiert und 12-16 Stunden bei 37° C inkubiert.

200 µl dieser Lösung wurden in die Vertiefung einer 96-Lochplatte (Nunc; Nunc, Wiesbaden) überführt, und die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen 630 nm Referenzwellenlänge in einem Mikrotiterplatten-Photometer (MR 7000; Dynatech, Denkendorf) bestimmt.

1.3. Viren

Das verwendete Influenza A-Virus Puerto Rico aus der achten Isolierung (A/PR/8) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt. Wegen der vielen Passagen kann das ursprünglich 1934 isolierte Virus als adaptiert bezeichnet werden.

1.4. Chemikalien

1.4.1. Medien und Medienzusätze

RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)

Biochrom, Berlin

MEM-EARLE

Biochrom, Berlin

L-Glutamin 200 mM (100x)

Biochrom, Berlin

HEPES-Pufferlösung 500 mM (100x)	Biochrom, Berlin
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 mg/ml)	Biochrom, Berlin
nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom, Berlin
humanes AB-Serum	Sigma, München
FCS	Gibco BRL, Schottland
Trypsin	Biochrom
PBS ^{def} : ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ -Ionen	Biochrom, Berlin
PBS ^{plus} : mit Mg ²⁺ /Ca ²⁺ -Ionen	Biochrom, Berlin

1.4.2. Farbstoffe

Diff-Quick	Baxter
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Türk'sche Lösung	Merck, Darmstadt

2. Methoden

2.1. Isolierung und Anreicherung humaner Blutleukozyten

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Blutleukozyten wurden frische „buffy coat“-Präparationen aus peripherem Venenblut gesunder Blutspender aus der Abt. f. Transfusionsmedizin im Klinikum der Philipps-Universität Marburg verwendet. „Buffy coats“ entstehen bei der Separation bestimmter Blutzellen (Herstellen von Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentraten) und enthalten neben den Granulozyten auch hochangereichert periphere, mononukleare Blutzellen (PBMC „peripheral blood mononuclear cells“). Die Präparation der PBMC-Fraktion erfolgte nach der Ficoll-Hypaque-Methode, durch die aufgrund von Dichteunterschieden mononukleare Zellen von anderen Blutzellen getrennt

T-Lymphozyten sowie NK-Zellen. Die weitere Aufreinigung der Monozyten erfolgte unter Verwendung der Counter flow-Zentrifugation (Elutriation).

Die Aufarbeitung erfolgte in 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner, Nürtingen). 12 ml vorgelegtes, 25° C warmes Ficoll (Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077 g/ml; Biochrom, Berlin) wurden vorsichtig mit „buffy“-Vollblut überschichtet (Endvolumen ca. 50 ml) und mit 400 x g bei Raumtemperatur für 40 Minuten zentrifugiert. Danach waren die Erythrozyten und Granulozyten als Sediment abgesetzt, die mononuklearen Zellen in einer Interphase oberhalb des Ficolls angereichert, und die Thrombozyten in dem darüber liegenden Serum ankonzentriert. Um die Ficoll-Lösung sowie restliche Erythrozyten und Thrombozyten zu entfernen, wurde nach Abnahme der oberen Phase die Interphase sorgfältig abpipettiert, mit 4° C kaltem PBS^{def} verdünnt und zweimal gewaschen. Zur Durchführung dieser Waschschrte wurden zwei Zentrifugationen bei 4° C mit 350 x g für 7 Minuten durchgeführt. Das Sediment wurde jeweils mit kaltem PBS^{def} vorsichtig, um eine Voraktivierung zu vermeiden, resuspendiert und auf 50 ml mit kaltem PBS^{def} aufgefüllt. Für die anschließende Aufreinigung der Monozyten durch die Elutriationsmethode wurde die PBMC-Fraktion nach der letzten Zentrifugation in insgesamt 40 ml RPMI^{sup} aufgenommen und direkt im Anschluß elutriert (siehe Material und Methoden: 2.3. Elutriation).

2.2. Isolierung und Anreicherung humaner neutrophiler Granulozyten

Ausgangsmaterial für die Isolierung von neutrophilen Granulozyten war das Sediment der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der PBMC-Fraktion aus „buffy coats“ (siehe Material und Methoden: 2.1. Isolierung und Anreicherung humaner Blutleukozyten). Dieses Sediment besteht im wesentlichen aus Granulozyten und Erythrozyten. Die Erythrozyten wurden durch eine Dextransulfatsedimentation (Dextran T 500; Pharmacia, Uppsala) und anschließende hypotone Lyse entfernt.

Das Sediment der Dichtegradientenzentrifugation wurde in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt, mit PBS^{def} auf 25 ml ergänzt und mit 25 ml 3%iger Dextransulfatlösung in PBS^{def} durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die obere, leukozytenreiche Phase abgenommen, in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und mit kaltem PBS^{def} auf 50 ml aufgefüllt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 350 x g für 7 Minuten und 4° C. Das Sediment wurde in 2-3 ml PBS^{def} vorsichtig resuspendiert und zur Lyse der restlichen Erythrozyten in 20 ml 0,2%iger NaCl-Lösung von 4° C aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Sekunden wurde die Zellsuspension durch Zufügen von 20 ml 1,6%iger NaCl-Lösung (4° C) wieder auf einen isotonischen Wert eingestellt. Zur Sedimentation der Zellen wurde 7 Minuten bei 350 x g und 4° C zentrifugiert. Der Präparationsschritt zur hypotonen Erythrozytenlyse wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Sediment in kaltem RPMI^{sup} + 0,1 % BSA resuspendiert. Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Zellzahl 1:10 in Türck's-Lösung verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspension bis zur Verwendung im Neutrophilen-Mikrochemotaxisassay bei 4° C gelagert (siehe Material und Methoden: 2.10.2. Neutrophilen-Chemotaxis).

Der Reinheitsgrad der präparierten neutrophilen Granulozyten wurde mit Hilfe einer histologischen Färbung bestimmt (siehe Material und Methoden: 2.4. Bestimmung des Reinheitsgrades der präparierten neutrophilen Granulozyten).

2.3. Elutriation („Counter flow-Zentrifugation“)

Die Elutriation bietet die Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer Größe und Dichte zu trennen. Dies wird möglich durch die Erzeugung zweier entgegengesetzt wirkender Kräfte. Durch die Rotation der Zentrifuge wird eine Sedimentationskraft hervorgerufen (Zentrifugalkraft), auf die ein von einer Pumpe erzeugter, kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom in entgegengesetzter Richtung entgegenwirkt

Jede Zelle in der Separationskammer wird in eine Zone wandern, in der ein Gleichgewicht zwischen ihrer Sedimentationsrate und der durch die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums erzeugten Zentripedalkraft herrscht. Innerhalb der Separationskammer wird durch ihre spezielle Geometrie ein Fließgeschwindigkeitsgradient erzeugt. Hierdurch wird es möglich, Zellen mit verschiedenen Sedimentationsraten in Suspension zu halten. Durch die schrittweise Erhöhung der Flüssigkeitsrate und der dadurch hervorgerufenen Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums oder durch die Verringerung der Rotordrehzahl können nach und nach relativ homogene Zellseparationen aus der Kammer ausgespült werden. Jede folgende Separation besteht aus größeren Zellen als die vorhergehende Fraktion (Kung et al., 1981; Grabske et al., 1978; Figdor et al., 1983).

Zwischen Flüssigkeitsrate und Rotordrehzahl besteht folgender Zusammenhang (Beckman, Instruction Manual):

$$F = X \times D^2 \times (\text{RPM} \times 10^{-3})^2$$

F = Flüssigkeitsrate in ml/min

X = Kammerfaktor: 0,0511

D = Zelldurchmesser in mm

RPM = Rotorumdrehungen pro min

Bei Verwendung einer konstanten Rotordrehzahl wird es mit Hilfe dieser Formel möglich, die Größe der Zellen zu berechnen, die bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums aus der Kammer ausgespült werden.

Für die Elutriationsversuche wurde das JE-6B Elutriationssystem mit dazugehörigem Rotor und der Standardseparationskammer verwendet (Beckman, Palo Alto). Die Standardkammer besitzt ein Volumen von 4,2 ml.

Die Durchführung der Elutration erfolgte bei der konstanten Rotorgeschwindigkeit von 2000 Umdrehungen pro Minute und bei 4°C. Zum Separieren der Zellen

Elutriationsmedium wurde PBS^{def} + 0,1 % BSA + 0,01 % EDTA verwendet. Pro Elutriationsschritt wurden $300-500 \times 10^6$ PBMCs eingesetzt.

Für die Aufreinigung der Monozyten wurde die aus „buffy coats“ durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene PBMC-Fraktion in 45 ml RPMI^{sup} aufgenommen und mit einer Pumpleistung von 7 ml/min in die Separationskammer eingezogen. Im Anschluß wurde bei 15 ml/min 5 Minuten gespült, um Thrombozyten und Erythrozyten zu entfernen. Durch die schrittweise Erhöhung der Fließgeschwindigkeit bis zu einer Pumpleistung von 28,5 ml/min wurden die in der PBMC-Fraktion enthaltenen Lymphozyten und NK-Zellen fast vollständig ausgewaschen. Mit der Erhöhung der Pumpleistung auf 36 ml/min wurde die Monozytenfraktion in 100 ml Elutriationsmedium separiert.

Die elutrierten Zellfraktionen wurden bei $350 \times g$ für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert, das Sediment resuspendiert und ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer 1:10 mit Türck's-Lösung verdünnt und ausgezählt.

Die Zellsuspension wurde auf 1,5 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 500 µl ($0,75 \times 10^6$ Monozyten) in die Vertiefung einer 24 Lochplatte (Falcon® Primaria; Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) pipettiert. Pro Vertiefung wurden zu diesen Zellen 25 µl AB-Serum hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 - 2 Stunden unter Standardbedingungen wurden die adhärenen Monozyten durch einmaliges Waschen mit 37° C warmem PBS^{plus} von den nichtadhärenen Zellen befreit. Die verbliebenen Zellen wurden je nach Versuchsansatz mit unterschiedlichen Volumina RPMI 1640^{sup} überschichtet und entweder sofort oder nach einer Ruhephase von 20 - 24 Stunden für die Infektions- bzw. Stimulationsversuche eingesetzt (siehe Material und Methoden: 2.6. Stimulation und Infektion der Zellen mit bakteriellen Modulinen bzw. Influenza A/PR/8).

Für die Kultivierung der Zellen in den Teflongefäßen wurde die elutrierte Monozytenfraktion auf eine Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ /ml eingestellt. 2 ml dieser Suspension wurden pro Gefäß pipettiert (5×10^6 Monozyten) und nach Zugabe von 5% AB-Serum unter Standardbedingungen inkubiert.

Für die Verwendung der Zellen im Mikrochemotaxisassay wurde die Monozytenfraktion auf $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI^{sup} + 0,1% BSA eingestellt und

2.4. Bestimmung des Reinheitsgrades der präparierten neutrophilen Granulozyten

Der Reinheitsgrad der präparierten neutrophilen Granulozyten wurde mit Hilfe einer histologischen Färbung bestimmt. Hierfür wurde ein Cytospinpräparat (70000 Zellen in 100µl, 600 rpm, 4 Minuten) (Cytospin 2; Shandon, Pittsburgh, PA, USA) der Zellsuspension angefertigt, mit einer differentiellen Blutbildfärbung angefärbt und die Anzahl der neutrophilen Granulozyten mikroskopisch ausgezählt.

Die Färbung wurde unter Verwendung eines kommerziellen Testsystems (Diff-Quik; Baxter Diagnostics AG, Schweiz) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Nach Auszählung der Cytospinpräparate im mikroskopischen Gesichtsfeld stellten sich über 93% der gefärbten Zellen als neutrophile Granulozyten dar.

2.5. Bestimmung des Reinheitsgrades der durch Elutriation präparierten Monozyten

2.5.1. Alpha-Naphthylacetat-Esterase-Färbung

Diese klassische Färbemethode zur Identifizierung von Monozyten/Makrophagen über die in ihnen vorhandene „unspezifische“ Esterase mit der Fähigkeit, Esterverbindungen wie alpha-Naphthylacetat zu hydrolysieren, wurde wie folgt durchgeführt: Die bei der Hydrolyse gebildete Naphtholverbindung erzeugte mit dem Diazoniumsalz Pararosanilin einen Komplex aus einem wasserunlöslichen Azofarbstoff, der sich intrazellulär als braun-schwarzer Niederschlag zeigte.

Diese Färbung wurde mit Hilfe eines kommerziellen Testsystems (Sigma, Deisenhofen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

In den durch Elutriation aufgereinigten Monozytenfraktionen stellten sich nach Auszählung der esterasepositiven Zellen im mikroskopischen Gesichtsfeld über

2.5.2. Differentielle Blutbildfärbung

Die differentielle Blutbildfärbung der elutrierten Monozyten wurde analog der Bestimmung des Reinheitsgrades der präparierten neutrophilen Granulozyten durchgeführt (siehe Material und Methoden: 2.4. Bestimmung des Reinheitsgrades der präparierten neutrophilen Granulozyten).

Die mikroskopische Auswertung der gefärbten Zellen ergab einen Anteil an Monozyten von 90-97%.

2.5.3. FACS-Analyse, Durchflußzytometrie

Eine weitere Möglichkeit zur Reinheitsbestimmung von Zellen stellt die FACS-Analyse dar („Fluorescence Activated Cell Sorting“). Zellen können mit dieser Methode bezüglich ihrer Oberflächenantigene, Größe und Granularität erfaßt werden. Hierbei werden Zellen mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert, und danach die markierten Zellen von den unmarkierten in einem elektronischen fluoreszenzaktivierten Zellsortierer abgetrennt. Die Einzelzellen, die in einem feinen Flüssigkeitsfaden hintereinander wandern, werden auf ihre Fluoreszenz hin geprüft, wenn sie einen Laserstrahl passieren. Zellgröße und Granularität werden anhand der Lichtstreuung einer vorderen und seitlichen, um 90° versetzten Lichtquelle gemessen. Durch Markierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können bis zu drei Oberflächenantigene parallel erfaßt werden. Die Darstellung der Daten kann als Histogramm erfolgen, in dem Zellzahl gegen Intensität der Fluoreszenz aufgetragen ist, oder als zweidimensionale Dot Blot-Darstellung, in der jeder Punkt eine Zelle entsprechend ihrer Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität repräsentiert.

Von den nach der Elutriationsmethode isolierten Zellfraktionen wurden je 100000 Zellen in Polystyren-Rundbodenröhrchen überführt (12 x 75 mm, Falcon; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), 4 µl der markierten Antikörper hinzupipettiert und mit kaltem PBS^{def} auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Monozyten wurden

Minuten auf Eis und im Dunkeln wurden die Zellen zweimal gewaschen. Hierzu wurde 1 ml 4° C kaltes PBS^{def} in jedes Röhrchen pipettiert, dieses 5 Minuten mit 300 x g bei 4° C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zur Fixierung der Zellen wurden je Röhrchen 50 µl 3%iges Formaldehyd (Merck, Darmstadt) in PBS^{def} zugegeben. Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 500 µl Trägerflüssigkeit (FACSFlow; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Die Auswertung erfolgte in einem FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) unter Berücksichtigung der Signale von je 5000 Zellen.

Verwendete Antikörper Lösungen:

- Anti-CD 14 FITC	Immunotech, Hamburg
- Anti-CD 3 / CD 19 FITC bzw. PE	Becton Dickinson, San Jose
- Anti-CD 56 PE	PharMinGen, Hamburg

Die Auswertung der FACS-Analyse zeigte, daß in der durch Elutriation aufgereinigten Fraktion mehr als 92% der Zellen Monozyten waren.

2.6. Stimulation und Infektion der Zellen mit bakteriellen Modulinen bzw. Influenza A/PR/8

Für die Stimations- bzw. Infektionsversuche wurden die über Elutriation aufgereinigten Monozyten sowie die Zelllinien Mono Mac 6 und THP-1 eingesetzt.

2.6.1. Stimulation der Monozyten mit bakteriellen Modulinen

Die Überstände der isolierten Zellen wurden nach der Ruhephase von 20 - 24 Stunden abgesaugt und in die Vertiefungen je 1 ml frisches RPMI^{sup} + 2% AB-Serum pipettiert. Entsprechend der Versuchsplanung wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der verwendeten bakteriellen Moduline stimuliert und über die angegebenen Zeiträume inkubiert.

Für die Restimulation der Zellen wurde der Überstand nach der ersten Inkubationszeit abgesaugt, durch 1 ml frisches RPMI^{sup} + 2% AB-Serum ersetzt und die Zellen mit einer weiteren Dosis des jeweiligen Modulins stimuliert.

Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Überstände abgenommen. Anschließend wurden sie zellfrei zentrifugiert (1200 x g, 10 Minuten, 4° C), portioniert und die Aliquots bei -70° C aufbewahrt.

Für die Gewinnung der Zellysate wurde der Überstand nach den entsprechenden Inkubationszeiten abgesaugt, die Zellen zweimal mit 37° C warmen PBS^{plus} gewaschen und anschließend 500 µl PBS^{def} + 0,1% Triton X 100 (Serva, Heidelberg) zugegeben. Die vollständige Lyse der Zellen erfolgte durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen. Die Zellysate wurden abzentrifugiert (1200 x g, 10 Minuten, 4° C) und die zellfreien Überstände portioniert und bei -70° C gelagert.

Die gewonnenen Überstände wurden mittels ELISA auf die freigesetzten Chemokine und Zytokine sowie im Mikrochemotaxisassay auf ihre chemotaktischen Aktivitäten überprüft.

Für die Langzeitkultivierung der Monozyten wurde nach einer Kultivierungsdauer von 3- 5 Tagen 50% des Überstandes verworfen und durch die entsprechende Menge frischem Mediums + 2% AB-Serum ersetzt.

2.6.2. Stimulation der Zelllinien mit LPS

Für diese Versuche wurden die Zellen geerntet und mit einer Zelldichte von $1 \times 10^6/2$ ml in dem entsprechenden Medium in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte pipettiert. Nach einer Ruhephase von 2 Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen LPS-Konzentrationen stimuliert und über die angegebenen Zeiträume inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl entsprechend der Versuchsplanung erneut ausplattiert. Nach einer Ruhephase von 2 Stunden wurden die Zellen mit einer weiteren LPS-Dosis restimuliert. Die induzierten Überstände wurden nach 24 Stunden gewonnen, zellfrei zentrifugiert und im

2.6.3. Infektion der Monozyten mit Influenza A/PR/8 und Stimulation durch Virosomen

Die isolierten Monozyten wurden entweder mit LPS stimuliert (Positivkontrolle), mit infektiösen Influenza A-Viren infiziert oder mit Virosomen stimuliert. Gleichzeitig wurde eine unbehandelte Negativkontrolle mitgeführt. Die nach den angegebenen Inkubationszeiten gewonnenen Überstände wurden mittels ELISA und Mikrochemotaxisassay auf ihre chemotaktischen Aktivitäten überprüft.

Die Überstände der isolierten Zellen wurden nach der Ruhephase abgesaugt. Entsprechend der Versuchsplanung wurde in die Vertiefungen der Positiv- und Negativkontrollen 1 ml, in die Vertiefungen mit den zu infizierenden Zellen 200 µl frisches RPMI^{sup} pipettiert. Die Stimulation wurde mit 2 MOI infektiösem Influenza A/PR/8, bzw. einer äquivalenten Dosis Virosomen durchgeführt. Die Virusadsorption erfolgte über einen Zeitraum von 45 Minuten bei 37° C unter Standardbedingungen. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS^{plus} (37° C) gewaschen und unter Zugabe von 1 ml frischem RPMI^{sup} + 2% AB-Serum weiter kultiviert. Gleichzeitig erfolgte die Stimulation der Zellen mit LPS (Endkonzentration 10 ng/ml). Das LPS (von E. coli 0127, B8W, Difco, Detroit, MI, USA) wurde zuvor mittels Ultraschall (Elma; Transsonic Digital, T 480/H-2) 3 Minuten bei Stufe 9 und 4° C suspendiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Überstände abgenommen. Anschließend wurden sie zellfrei zentrifugiert (1200 x g, 10 Minuten, 4° C), portioniert und die Aliquots bei -70° C aufbewahrt.

2.6.4. Inkubation der Monozyten in Teflongefäßen

Die über Elutriation aufgereinigten Monozyten wurden auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ /ml in RPMI^{sup} + 5% AB-Serum eingestellt. 2 ml dieser Zellsuspension wurden anschließend pro Teflongefäß (Teflongefäße mit 15 ml und rundem Innenboden; Savillex Corp., Minnetonka, MN, USA) pipettiert. Die Stimulation der Monozyten erfolgte entsprechend der Versuchsplanung direkt in den

Teflongefäßen. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden die Überstände abgenommen, zellfrei zentrifugiert und portioniert bei -70° C gelagert. Für die Gewinnung der stimulierten Zellen wurden die Teflongefäße nach den Inkubationszeiten für 30 Minuten bei 4° C inkubiert, die Zellen gut resuspendiert, zentrifugiert und anschließend zweimal mit PBS^{def} gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in RPMI^{sup} + 0,1% BSA resuspendiert und die Zellzahl auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Bis zur Verwendung der Monozyten im Mikrochemotaxisassay wurden die Zellen bei 4° C gelagert. Für Langzeitkulturen wurde nach einer Inkubationszeit von 3 - 5 Tagen 50% des Überstandes abpipettiert und die darin enthaltenen Zellen mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml frischem RPMI^{sup} + 5% AB-Serum resuspendiert und mit den entsprechenden Kulturen wiedervereinigt.

2.7. Vermehrung und Reinigung von Influenza A-Viren

Als Vermehrungssystem für das Influenza A-Virus dienen 11 Tage alte Hühnerembryonen (Barrett und Inglis, 1985). Das Virusinokulum wird in die Allantoishöhle injiziert, von wo aus es die Chorioallantoismembran infiziert. Replizierte Viruspartikel werden in die Allantoisflüssigkeit abgegeben. Die Ernte dieser Flüssigkeit erfolgt 2 Tage nach der Infektion. Zur Reinigung des Virus werden mehrere Zentrifugationsschritte durchgeführt, einschließlich einer Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.

2.7.1. Vorbereitung der Eier und Beimpfung

Befruchtete Hühnereier wurden 11 Tage bei 37° C und 40-60 % relativer Luftfeuchtigkeit gelagert und dabei alle 6 h gewendet. Mit Hilfe einer UV-Schierlampe (Blohm Apparatebau, Hamburg) wurden für die Beimpfung Embryonen mit einer intakten Gefäßversorgung und einer erkennbaren

markierte Injektionsstelle mit Jodlösung (0,05 M J₂, Tritisol; Merck, Darmstadt) desinfiziert. Wenige Millimeter oberhalb der Kennzeichnung wurde die Kalkschale angebohrt. Pro Ei wurden 0,2 ml Virusinokulum mit einer feinen Kanüle injiziert. Als Virusinokulum wurde native, virushaltige Allantoisflüssigkeit, die 1:1000 in PBS^{def} verdünnt wurde, verwendet. Als Schutz vor weiteren Infektionen wurde das Bohrloch mit Holzleim verschlossen. Die beimpften Eier wurden für 48 Stunden bei 37° C und 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Embryonen, die während der Inkubationszeit abstarben, wurden mit Hilfe der Schierlampe aussortiert.

2.7.2. Ernte der virushaltigen Allantoisflüssigkeit

Die Abkühlung der verwendeten Eier über Nacht (4-18 h) bei 4° C führte zur Gefäßkonstriktion und somit zum Absterben der Embryonen. Nach Desinfektion des stumpfen Eipols wurde die Kalkschale oberhalb der Luftkammergrenze abgetragen, die virushaltige Allantoisflüssigkeit vorsichtig mit einer Kanüle und einer 10 ml Spritze (Omnifix^R; Braun, Melsungen) abgesaugt und auf Eis gelagert. Es wurde nur klare Flüssigkeit gesammelt. Jede hämorrhagische, dotter-gelbe oder weißlich-trüb verunreinigte Suspension wurde verworfen. Aus jedem Ei konnten etwa 7-12 ml Allantoisflüssigkeit geerntet werden.

2.7.3. Reinigung des Influenza A-Virus

Durch den ersten Zentrifugationsschritt (30 Minuten, 6000 rpm, 4° C, ohne Bremse) (Rotor JA-10, Zentrifuge J21; Beckman, München) sedimentierten Zelltrümmer und Zellen. Das Virus wurde durch Zentrifugation des Überstandes (55 Minuten, 18000 rpm, 4° C, ohne Bremse) (Rotor JA-10, Ultrazentrifuge L7-55; Beckman, München) pelletiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes und Übersichtung des Virussediments mit 500 µl je Zentrifugenbecher konnte das Virus 1 Stunde auf Eis quellen. Anschließend wurde das Pellet sorgfältig resuspendiert - zunächst mit einer feinen Kanüle, dann mit einer 1 ml-

Saccharose (in 5 %-Schritten, w/v) verdünnt in PBS^{def} hergestellt. Diese wurden als Gradient in für 90 Minuten mit 3 % H₂O₂ (Merck, Darmstadt) sterilisierte Ultra-ClearTM tubes (Röhrchenvolumen: ca. 39 ml) eingefüllt. Dazu wurden 6,1 ml einer jeden Saccharosekonzentration, bei 55 % beginnend, mit der nächst niedrigeren Konzentration überschichtet, endend bei 30 % Saccharose. Bei der Lagerung über Nacht bei 4° C glichen sich die unterschiedlichen Konzentrationen zu einem kontinuierlichen Gradienten an. Der Gradient eines jeden Röhrchens wurde dann mit 1,5 ml der ankonzentrierten Virussuspension überschichtet und bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert (16 Stunden, 24000 rpm, 4° C, ohne Bremse) (Rotor SW28, Ultrazentrifuge L7-55; Beckman, München). Am Ende dieser Zentrifugation fanden sich in der gelblich-klares Zuckerlösung weißlich-trübe Zonen, die das Virus enthielten. Der höchste Titer war in der deutlichsten Bande im unteren Viertel des Gradienten bei ca. 45 % Saccharose zu finden. Nach großzügiger Abnahme dieser Bande wurde sie mit kaltem PBS^{def} vermischt und zur Viruspelletion erneut zentrifugiert (45-60 Minuten, 24000 rpm, 4° C, ohne Bremse) (Rotor SW28, Zentrifuge L7-55; Beckman, München). Quellvorgang und Resuspendierung schlossen sich wie oben beschrieben an. Verbliebene Virusaggregate konnten durch eine erneute Zentrifugation (5 Minuten bei 3000 rpm) entfernt werden.

2.7.4. Dialyse und Lagerung

Der verwendete Dialyseschlauch (Schlauch Visking mit 1,5-3 nm Porenweite; Roth, Karlsruhe) wurde zur Entfernung von beispielsweise Glycerin, Spuren von Schwefelverbindungen und Schwermetallen 1 Stunde in EDTA-Lösung (100 mM EDTA-Na₂-Salz; Serva, Heidelberg) erhitzt. Die Virussuspension wurde in den Schlauch eingefüllt und dieser an den Enden möglichst luftblasenfrei durch Knoten verschlossen. Die Dialyse erfolgte bei 4° C für 21 Stunden gegen das 500-fache Volumen PBS^{def}.

Im parallel durchgeführten HA-Test wurde der Virustiter in HAU (Hämagglutinationstiter)/ml ermittelt. Dieser Test basiert auf der spezifischen

Anschließend wurde das Dialysat mit PBS^{def} auf einen Titer von 10^5 HAU/ml eingestellt und in Aliquots von 400-500 µl bei -170° C gelagert.

Die Ermittlung des Infektionstiters als PFU („plaque forming units“)/ml erfolgte im Plaque-Test, bei dem eine virushaltige Probe auf permissive MDCK II-Zellen (Madin and Darby Canine Kidney cell) gegeben wurde. Hierbei wird unter Verwendung eines agarosehaltigen Mediums eine Ausbreitung der Infektion verhindert, so daß durch die Lyse infizierter Zellen zellfreie Areale als sogenannte Plaques ausgezählt werden können (Wagner, 1961).

2.8. Inaktivierung von Influenza A-Viren

2.8.1. UV-Inaktivierung

Die UV-Inaktivierung der Influenza A Viren erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm (MinUVIS, Desaga).

Hierzu wurden je 250 µl der Virusstammlösung (5×10^7 PFU/ml) in die Vertiefungen einer 4 Lochplatte (Nunclon; Nunc, Wiesbaden) pipettiert und auf Eis bei der angegebenen Wellenlänge für 30 Minuten bestrahlt.

2.8.2. Inaktivierung bei 56° C

500 µl der Virusstammlösung (5×10^7 PFU/ml) wurden im Einfrierröhrchen für 30 Minuten bei 56° C im Wasserbad inkubiert.

2.8.3. Inaktivierung bei 100° C

500 µl der Virusstammlösung (5×10^7 PFU/ml) wurden im Einfrieröhrchen für 30

Die Viren wurden nach dem Inaktivierungsschritt auf Eis gelagert und unmittelbar vor dem Infektionsschritt zum Einstellen der benötigten Endkonzentration mit RPMI^{sup} verdünnt.

2.9. Virosomen

Als Virosomen bezeichnet man die Hülle eines Virus mit den eingelagerten viralen Membranproteinen. Die Membranhülle wurde durch ein Detergens und Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Anschließend wurde das virale Kapsid durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Nach der Entfernung des Detergens aus der Lösung bilden die Membranen, ähnlich Micellen, wieder eine vollständige, dreidimensionale Virushülle ohne innere Strukturen aus (Dijkstra et al., 1996;). Die entstandenen Virosomen sind aufgrund des Fehlens der RNA nicht mehr infektiös.

2.9.1. Virosomenpräparation

Zu der unverdünnten Virussuspension wurde ein gleiches Volumen des Detergens ODG (N-Octyl- β -D-Glycopyranosid, 3% in PBS^{def}; Sigma, München) gegeben und insgesamt 30 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem, vorsichtigem Schwenken inkubiert. Zum vollständigen Aufbrechen der Membran wurde die Lösung nach 10 Minuten ins Ultraschallbad (Elma, Transsonic Digital S) gestellt und 10 Minuten auf höchster Stufe beschallt. Die Lösung wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und bei 26000 rpm für 1 Stunde bei 4° C zentrifugiert (Zentrifuge L7-55, Rotor SW 55; Beckman, München). Dadurch wurden nicht gelöste, große Virusbestandteile sowie das Nukleokapsid und die darin enthaltene RNA pelletiert und so von den Hüllproteinen abgetrennt, die gelöst im Überstand blieben.

Zum Entfernen des Detergens wurde der Überstand der Zentrifugation anschließend zu autoklavierten SM2-Beads (Bio Rad) gegeben, wobei die Menge

3%igen ODG-Lösung eingesetzt worden waren). Die Beads können über Poren das Detergens adsorbieren und es so aus der Lösung entfernen (Levy et al., 1990). Nach einer Stunde auf dem Schwenktisch und anschließender Sedimentation der Beads wurde der Überstand abgenommen und der Vorgang wiederholt.

Zur vollständigen Entfernung des ODG wurde abschließend der Überstand in einen Dialyseschlauch aus Zellulose (Schlauch Visking mit 1,5 - 3 nm Porenweite; Roth, Karlsruhe) überführt, der zuvor in 0,02 M EDTA-Lösung (EDTA-Na₂-Salz; Serva, Heidelberg) aufgekocht wurde, um unerwünschte Substanzen zu entfernen, und über Nacht bei 4° C im 100-fachen Volumen gegen PBS^{def} dialysiert. Das PBS^{def} wurde dabei 4 -5 mal gewechselt. Am Schluß wurde gegen RPMI^{sup} dialysiert.

Die Virosomensuspension wurde aus dem Dialyseschlauch abgezogen und in ein Probenröhrchen überführt. Sie konnte bis zu einer Woche auf Eis gelagert werden. Danach waren, wie im Elektronenmikroskop zu beobachten war, keine intakten Virosomen mehr enthalten.

Wie die Viren wurden auch die präparierten Virosomen im LAL-Test auf Endotoxinkontaminationen überprüft. Um Aussagen über die Hämagglutininierungseigenschaften der Virosomen treffen zu können, wurde weiterhin der HAU/ml (Hämagglutininierungseinheiten/ml) im HA-Test festgestellt. Außerdem wurden die Virosomen im Plaque-Test überprüft, um sicherzustellen, daß keine infektiösen Partikel mehr enthalten waren.

2.9.2. Western Blot (Dot Blot) zum Nachweis von Virusproteinen

Der Nachweis der viralen Proteine wurde für die weitere Qualitätsüberprüfung der präparierten Virosomen eingesetzt. Hierbei wurde untersucht, ob in den Virosomen noch Reste des Nukleoproteins enthalten waren und wie hoch der prozentuale Anteil im Vergleich zu den Viren noch war. Dabei wurden die Proteine zunächst in einer Dot Blot-Kammer auf eine Trägermatrix

Chemilumineszenz sichtbar gemacht wurden. Verwendet wurde dazu der ECL-Kit (enhanced chemiluminescence; Amersham, Braunschweig). Er beruht auf dem Prinzip, daß ein Substrat (Luminol) durch HRP (Horseradish-Peroxidase) oxidiert und damit in einen angeregten Zustand überführt wird. Bei der Rückkehr in den Ausgangszustand wird Energie in Form von Licht frei, das mittels eines Röntgenfilms detektiert werden kann. Die Lichtemission wird durch die Anwesenheit von Enhancern (z. B. Phenolen) bei der Oxidation noch verstärkt. Die Lichtintensität ist direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Enzyms und damit zur spezifischen Proteinmenge, die auf der Membran gebunden ist.

Für die Durchführung wurde die Nitrozellulosemembran für 20 Minuten in A. dest eingeweicht und anschließend fest in die Dot Blot-Kammer eingespannt. Die Verdünnungsreihen der Virus- und der Virosomenpräparation wurden aufgetragen und die Flüssigkeit mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Dabei wurden die in der Probe enthaltenen Viren oder Virosomen durch den Sog auf die Membran gepreßt, so daß sie zerstört wurden und die innen liegenden Proteine nun zugänglich für den Antikörper waren. Die Membran wurde vorsichtig entnommen und luftgetrocknet. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Blockpuffer abgesättigt. Hierfür wurde die Membran 1 Stunde in Blockpuffer (PBS^{def} + 5% BSA + 0,1% Tween 20) inkubiert. Danach wurde die Membran 1 x 15 Minuten und 2 x 5 Minuten in Waschpuffer (PBS^{def} + 0,1% Tween 20) gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit dem 1. Antikörper inkubiert. Hierfür wurde entweder ein monoklonaler Antikörper gegen das virale Matrixprotein oder gegen das virale Nukleoprotein verwendet. Nach einem Waschschriff wie oben wurde 30 Minuten mit dem 2. Antikörper inkubiert und danach 1 x 15 Minuten und 4 x 5 Minuten gewaschen. Zur Färbung wurden die Reagenzien aus dem Kit auf eine Plastikfolie gegeben und die Membran mit der Oberfläche für 1 min daraufgelegt. Nachdem die Färbelösung entfernt worden war, wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die Signale konnten durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden, wobei die Expositionszeiten variiert wurden. Die Entwicklung des Films erfolgte mit Photochemikalien von Agfa-Gefaert (Entwickler C 450; Fixierer C 254).

2.10. Chemotaxis

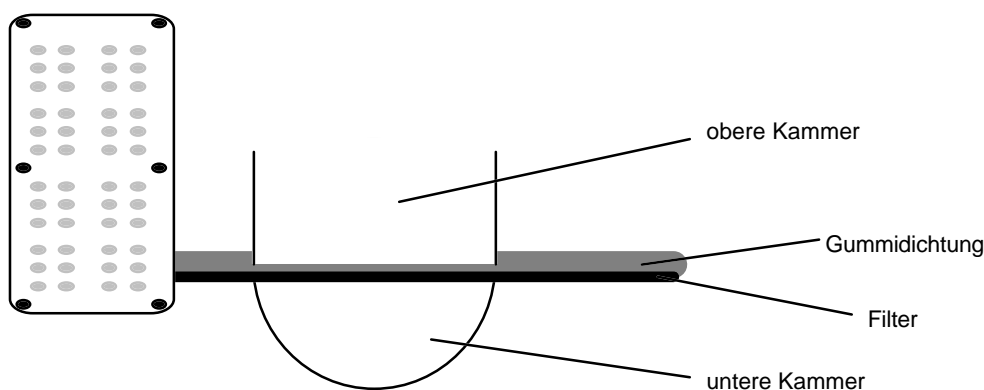
Als Chemotaxis bezeichnet man die durch eine chemotaktisch aktive Substanz bewirkte Zellmigration durch natürliches oder synthetisches Gewebe.

Im Chemotaxisassay wurde eine 10 µm dicke Polycarbonatmembran mit einer Fläche von 25 mm x 80 mm verwendet. Sie besitzt gerade, zylindrische Poren und eine glatte Oberfläche. Die dem chemotaktischen Stimulus entgegengewanderten und an der Polycarbonatmembran adhären bzw. hindurchgewanderten Zellen können durch histologische Färbungen oder durch ihre Enzymaktivität analysiert werden.

Für die Chemotaxis sind als erste die blind-well und Boyden-Kammern aus Acryl verwendet worden, die sich durch unterschiedliche Volumina für Reagenz- und Zellsuspension unterscheiden.

Die von uns verwendete 48-well Mikrochemotaxiskammer besteht aus zwei Acrylplatten und einer Dichtung. Während die Grundplatte 48 Vertiefungen mit einem jeweiligen Volumen von 25 µl und einer exponierten Filterfläche von 3,17 mm² besitzt, enthält die Oberplatte 48 durchgehende Löcher korrespondierend zu den 48 Vertiefungen der unteren Platte. Bei zusammengesetzter Kammer werden diese Löcher zu Vertiefungen für die Zellsuspension.

Eine Dichtung, ebenfalls mit 48 Löchern versehen, liegt auf dem Membranfilter. Dichtung und Filter werden übereinander zwischen oberer und unterer Platte zentriert und mittels Schrauben zu einer Kammer verschlossen (Falk et al., 1979).



Zur Bestimmung der Zellmigration wurden 27 µl der chemotaktischen Stimuli in die unteren Vertiefungen der 48-well Mikrochemotaxiskammer pipettiert. Das obere Kompartiment wurde mit 50 µl der jeweiligen Zellsuspension gefüllt. Zum Separieren der Kammern wurden Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 5 µm (Monozyten-Chemotaxis) bzw. 3 µm (Neutrophilen-Chemotaxis) verwendet. Nach der Inkubationszeit wurde die Anzahl der migrierten Monozyten densitometrisch, die Anzahl der migrierten neutrophilen Granulozyten enzymatisch bestimmt.

2.10.1. Monozyten-Chemotaxis

Für die Monozyten-Chemotaxis in der 48-well Mikrochemotaxiskammer wurden die durch Elutriation (siehe Methoden: 2.2.3. Elutriation) aufgereinigten Monozytenfraktionen eingesetzt.

Die beiden Kammerteile wurden durch eine Polyvinylpyrrolidon-freie Polycarbonatmembran mit 5 µm Poren (Costar, Bodenheim) getrennt. Die glänzende Filterseite zeigte dabei nach oben. In die unteren Vertiefungen der Kammer wurden 27 µl der konditionierten Überstände pipettiert. Als Positivkontrollen dienten eine 10^{-8} M fMLP-Verdünnung (Sigma, München) und 50 ng/ml rekombinantes, humanes MCP-1 (IC Chemikalien GmbH, Ismaning). RPMI^{sup} + 0,1 % BSA wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

50 µl der Zellsuspension ($2,5 \times 10^6$ Monozyten/ml in RPMI^{sup} + 0,1 % BSA) wurden in die oberen Vertiefungen pipettiert und die Kammer 1 Stunde bei 37° C inkubiert.

Danach wurde die Polycarbonatmembran vorsichtig entnommen, die obere Seite zum Entfernen von sedimentierten Zellen dreimal in PBS^{def} gewaschen und an einer Gummilamelle abgewischt. Die durch die Poren der Membran hindurchgewanderten und auf der unteren Seite adhärenen Monozyten wurden 10 Sekunden in Methanol (Merck, Darmstadt) fixiert und in Hämatoxylin-Lösung (Gill No 3; Sigma, München) für 10 Minuten gefärbt. Zur Hintergrundreduktion wurden die Membranen 10 Sekunden mit einer HCl/Alkohol-Lösung (1 % HCl in

Die Quantifizierung der migrierten Zellen erfolgte densitometrisch mit Hilfe eines Computer-gestützten Imaging-Systems (Vilber Lourmat, Fröbel, Wasserburg) aus vier parallelen Ansätzen.

2.10.2. Neutrophilen-Chemotaxis

Für die Neutrophilen-Chemotaxis in der 48-well Mikrochemotaxiskammer wurden die durch Dextransulfatsedimentation und hypotone Erythrozytenlyse (siehe Methoden: 2.2.2. Isolierung und Anreicherung humaner neutrophiler Granulozyten) aufgereinigten neutrophilen Granulozyten eingesetzt.

Die beiden Kammerteile wurden durch eine vorbehandelte, Polyvinylpyrrolidon-haltige Polycarbonatmembran mit 3 µm Poren (Costar, Bodenheim) getrennt. Die glänzende Membranseite zeigte dabei nach unten. Zur Vorbehandlung wurde die Membran jeweils 10 Minuten in 100 %igem Ethanol (Merck, Darmstadt), einem Ethanol/NaOH-Gemisch (2 g NaOH in 25 ml A. dest. + 25 ml 100 %iges Ethanol) und einem 0,1 M Phosphatpuffer (1,78 g Di-Natriumhydrogenphosphat in 100 ml Aqua dest., pH-Wert 7) inkubiert.

In die unteren Vertiefungen der Kammer wurden 27 µl der konditionierten Überstände pipettiert. Als Positivkontrolle dienten eine 10^{-8} M fMLP-Verdünnung und 50 ng/ml rekombinantes, humanes IL-8 (IC Chemikalien GmbH, Ismaning). RPMI^{sup} + 0,1 % BSA wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

50 µl der Neutrophilensuspension (2×10^6 Zellen/ml in RPMI^{sup} + 0,1 % BSA) wurden in die oberen Vertiefungen pipettiert und die Kammer 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Polycarbonatmembran entfernt und 20 µl aus den Vertiefungen der unteren Kammer in entsprechende Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) überführt. Zur Lyse der verbliebenen Zellen wurde in jede Vertiefung der Chemotaxiskammer 10 µl einer Triton X 100-Lösung (1 % in A.dest.) (Serva, Heidelberg) pipettiert und 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde gründlich resuspendiert und die restliche Flüssigkeit aus der Chemotaxiskammer in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte überführt. Das Volumen in der Mikrotiterplatte wurde durch Zugabe von 75 µl

Anschließend wurde die Anzahl der migrierten neutrophilen Granulozyten durch die Messung der β -Glucuronidaseaktivität enzymatisch bestimmt. Hierzu wurden 100 μ l Substratlösung (p-Nitrophenyl- β -D-Glucuronid; Sigma, München) (0,01 M in 0,1 M Acetatpuffer, pH-Wert 4) pro Vertiefung pipettiert und 12-16 Stunden bei 37° C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l Glycinpuffer (0,4 M Glycin in Aqua dest., pH-Wert > 10) gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (MR 7000; Dynatech; Denkendorf) bestimmt. Die aus vier parallelen Ansätzen durchgeführte Quantifizierung der migrierten Zellen wurde auf der Basis mitgeführter Standardreihen mit Hilfe eines geräteinternen Auswertungsprogrammes (Advanced Programm, Version 3.1) berechnet.

2.11. ELISA's (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Die ELISA-Systeme wurden auf dem Prinzip der Sandwich-Technik entwickelt. Hierzu wird ein Antikörper, der gegen eine zu testende Substanz gerichtet ist, über unspezifische Wechselwirkungen an eine feste Phase (Kunststoffoberfläche) gekoppelt. Die gesamte Analytmenge in einer gegebenenfalls zu verdünnenden Probe wird so an die spezifischen Antikörper gebunden. Ein zweiter Antikörper reagiert mit einer anderen Antigen determinanten des an den ersten Antikörper gebundenen Analyten (Sandwich-Komplex). Die MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α ELISA's funktionierten mit biotinylierten 2. Antikörpern und Zugabe eines Streptavidin-POD Komplexes. Im Gegensatz dazu wurden bei den IL-8, GRO- α , MCP-3, RANTES und IL-1 β ELISA's POD-gekoppelte 3. Antikörper benutzt, die eine antigene Determinante des zweiten Antikörpers erkennen. Die durch ein Enzym anschließend umgesetzte Substratmenge ist direkt proportional der Konzentration des gesuchten Analyten.

Die Beschichtung der 96-Loch Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) erfolgte zunächst mit 100 μ l der Verdünnung des ersten Antikörpers über 12-16

Blockpuffer pro Vertiefung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift wurden die Standardverdünnungen und die Proben (100 µl/Vertiefung) pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Probenmaterial wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend wurden 100 µl der Verdünnung des zweiten Antikörpers pro Vertiefung pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Ausbildung des Sandwich-Komplexes). Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Platten entfernt. Danach wurden 100 µl der Verdünnung des peroxidasekonjugierten dritten Antikörpers oder des verdünnten Streptavidin-POD-Konjugates pro Vertiefung pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte der Start der Enzymreaktion durch Zugabe des Peroxidase-Substrates (o-Phenylendiamin x 2 HCl) (als kommerzielles Testsystem eingesetzt nach den Angaben des Herstellers; Abbott Laboratories, Wiesbaden).

Die auftretende Farbreaktion wurde nach 5-10 Minuten mit 50 µl 2,5 M H₂SO₄ (Merck, Darmstadt) gestoppt. Deren Absorption wurde im Mikroplatten-Photometer (MR 7000; Dynatech, Denkendorf) bei 490 nm gemessen. Die aktuellen Konzentrationen wurden durch eine Standardreihe mit Hilfe eines geräteinternen Auswertungsprogrammes (Advanced Programm, Version 3.1) des Mikroplatten-Photometers berechnet.

Für die Durchführung der ELISA´s wurden folgende Lösungen benötigt:

- 1) Beschichtungspuffer: PBS^{def}
- 2) Waschpuffer: PBS^{def} + 0,05 % Tween 20
- 3) Block- und Probenverdünnungspuffer: PBS^{def} + 0,05 % Tween 20 + 2 % BSA

2.11.1. IL-8 ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human IL-8 (0,5 mg/ml) (Innogenetics, Asbach)
Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer
 2. Antikörper: Rabbit anti-human IL-8 (1 mg/ml) (Innogenetics, Asbach)
Verdünnung 1:800 in Probenverdünnungspuffer
 3. Antikörper: Donkey anti-rabbit IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml)
(Dianova, Hamburg)
Verdünnung 1:5000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes IL-8 (IC Chemikalien, Ismaning)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.11.2. GRO- α ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human GRO- α (0,5 mg/ml) (Sigma, München)
Verdünnung 1:250 in Beschichtungspuffer
 2. Antikörper: Goat anti-human GRO- α (1mg/ml) (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer
 3. Antikörper: Donkey anti-goat IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml)
(Dianova, Hamburg)
Verdünnung 1:5000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes GRO- α (R&D, Wiesbaden)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.11.3. MCP-1 ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human MCP-1 (0,5 mg/ml)
(PharMingen, Hamburg)
Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Rabbit anti-human MCP-1 Biotin-konjugiert (0,5 mg/ml)
(PharMingen, Hamburg)
Verdünnung 1:1000 in Probenverdünnungspuffer
- POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml)
(Boehringer Mannheim, Mannheim)
Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes MCP-1 (IC Chemikalien, Ismaning)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 200 pg/ml bis 12,5 ng/ml

2.11.4. MCP-3 ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human MCP-3 (0,5 mg/ml) (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Goat anti-human MCP-3 (1 mg/ml) (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1:1000 in Probenverdünnungspuffer
3. Antikörper: Donkey anti-goat IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml)
(Dianova, Hamburg)
Verdünnung 1:5000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes MCP-3 (R&D, Wiesbaden)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.11.5. MIP-1 α ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human MIP-1 α (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Goat anti-human MIP-1 α Biotin-konjugiert (50 mg/ml)
(R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1: 625 in Probenverdünnungspuffer
- POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml)
(Boehringer Mannheim, Mannheim)
Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes MIP-1 α (IC Chemikalien, Ismanig)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 200 pg/ml bis 12,5 ng/ml

2.11.6. MIP-1 β ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human MIP-1 β (0,5 mg/ml) (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1:250 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Goat anti-human MIP-1 β Biotin-konjugiert (50 mg/ml)
(R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1: 2000 in Probenverdünnungspuffer
- POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml)
(Boehringer Mannheim, Mannheim)
Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes MIP-1 β (R&D, Wiesbaden)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 50 pg/ml bis 3,125 ng/ml

2.11.7. RANTES ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human RANTES (1 mg/ml) (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung: 1:1000 in Beschichtungspuffer
 2. Antikörper: Goat anti-human RANTES (1 mg/ml) (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer
 3. Antikörper: Donkey anti-goat IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml)
(Dianova, Hamburg)
Verdünnung 1:5000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes RANTES (IC Chemikalien, Ismaning)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.11.8. IL-1 β ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human IL-1 β (0,5 mg/ml) (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer
 2. Antikörper: Goat anti-human IL-1 β (1mg/ml) (R&D, Wiesbaden)
Verdünnung: 1:500 in Probenverdünnungspuffer
 3. Antikörper: Donkey anti-goat IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml)
(Dianova, Hamburg)
Verdünnung 1:5000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes IL-1 β (R&D,Wiesbaden)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 40 pg/ml bis 2,5 ng/ml

2.11.9. IL-6 ELISA

1. Antikörper: Rat anti-human IL-6 (0,5 mg/ml) (PharMingen, Hamburg)
Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Rat anti-human IL-6 Biotin-konjugiert (0,5 mg/ml)
(PharMingen, Hamburg)
Verdünnung 1:1000 in Probenverdünnungspuffer
- POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml)
(Boehringer Mannheim, Mannheim)
Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes IL-6 (PBH, Hannover)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 150 pg/ml bis 10 ng/ml

2.11.10. IL-10 ELISA

1. Antikörper: Rat anti-human IL-10 (0,5 mg/ml) (PharMingen, Hamburg)
Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Rat anti-human IL-10 Biotin-konjugiert (0,5 mg/ml)
(PharMingen, Hamburg)
Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer
- POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml)
(Boehringer Mannheim, Mannheim)
Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes IL-10 (PharMingen, Hamburg)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 15 pg/ml bis 1 ng/ml

2.11.11. TNF- α ELISA

1. Antikörper: Mouse anti-human TNF- α (1 mg/ml)
(BASF/Knoll AG, Ludwigshafen)
Verdünnung: 1:200 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper: Mouse anti-human TNF- α (0,5 mg/ml)
(PharMingen, Hamburg)
Verdünnung 1:1000 in Probenverdünnungspuffer
- POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml)
(Boehringer Mannheim, Mannheim)
Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
- Standard: rekombinantes humanes TNF- α (PharMingen, Hamburg)
eingesetzter Konzentrationsbereich: 300pg/ml bis 20 ng/ml

2.12. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Zum Studium der mRNA-Expression monozytärer Zellen wurde nach LPS-Stimulation oder Virusinfektion die Gesamt-RNA präpariert, und das Vorhandensein von spezifischen mRNAs durch Hybridisierung mit komplementären, DIG-markierten RNA-Sonden im Northern Blot analysiert. Der optische Nachweis erfolgte mit Hilfe nicht radioaktiver Techniken. Spezifische Sonden wurden mit Hilfe der RT-PCR aus der RNA stimulierter Monozyten hergestellt. Anschließend wurden diese zur Vervielfältigung in Plasmide einkloniert. Die RNA-Sonden für die humanen Chemokine IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und RANTES sowie für das Zytokin TNF- α standen bereits am Institut für Immunologie zur Verfügung. Anke Friedetzky, Institut für Immunologie, stellte die Sonde für das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) her.

2.12.1. Northern Blot-Analyse der Genexpression

2.12.1.1. Präparation von RNA

Zur RNA-Isolierung wurde die erstmals von Chomcynski und Sacchi beschriebenen „single step“-Methode zur RNA-Präparation (Chomcynski und Sacchi, 1987) unter Verwendung von Guanidiniumthiocyanat (GTC) und Phenol/Chloroform durchgeführt. GTC und im schwächerem Maße Phenol dienen der Denaturierung der enthaltenen Proteine. RNasen werden durch GTC und 1-Mercaptoethanol inaktiviert. Das Detergens N-Laurylsarkosyl dient zum Aufbrechen der Zellmembranen. Durch die Extraktion mit saurem Phenol werden die DNA sowie die denaturierten Proteine entfernt. Eine weitergehende physikalische Trennung der RNA von anderen Komponenten erfolgt durch eine Präzipitation mit Ethanol, in welchem die RNA nicht löslich ist.

Ein prinzipielles Problem bei der Isolierung von RNA ist die Tatsache, daß die in Form eines Einzelstrangs vorliegende RNA anfällig gegenüber abbauenden Enzymen (RNasen) ist. Daher ist bei allen Versuchsschritten als RNase-Schutz auf Eis zu arbeiten, DEPC-behandeltes Wasser zu benutzen und Sorge zu tragen, daß keine exogenen RNase-Kontaminationen, beispielsweise durch unzureichend sterilisierte Gefäße oder Pipettenspitzen, möglich sind.

Für die RNA-Präparation wurden humane Monozyten wie oben beschrieben aus Buffy-coat-Blut isoliert. Da für die Präparation von RNA größere Zellzahlen notwendig waren, wurde die weitere Aufarbeitung der Zellen durch Adhärenz in Falcon®-primaria Gewebekulturschalen (Durchmesser 6 cm) mit einer Zellzahl von 1×10^7 Monozyten pro Ansatz durchgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte analog dem für die Überstände beschriebenen Vorgehen. Anschließend erfolgte die weitere Inkubation in 7 ml RPMI^{sup} + 2% AB-Serum. Nach der Stimulation der Monozyten wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS^{plus} gewaschen. Die Zellen jeder Petrischale wurden mit 500 µl Lösung D lysiert und gegebenenfalls vorübergehend bei -70° C aufbewahrt.

Lösung D setzte sich wie folgt zusammen:

Guanidinium-Thiocyanat	4 M	(Fluka, Neu-Ulm)
Natriumcitrat, pH 7,0	25 mM	(Roth, Karlsruhe)
N-Laurylsarkosyl	0,5%	(Sigma, München)
2-Mercaptoethanol	0,1 M	(Merck, Darmstadt)

Danach wurde das Zellysat durch Ausschaben der Schalen mit Hilfe eines sterilen Gummischabers vom Boden des Gefäßes abgelöst. Zur mechanischen Zerkleinerung der in der Zellsuspension enthaltenen DNA wurde das Lysat mehrfach durch eine Injektionskanüle (24 g) aufgezogen und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg) überführt. Zur RNA-Extraktion wurden 0,1 Volumen (50 μ l) 3 M Natriumazetat (pH 4,2) zugegeben. Anschließend wurden 1 Volumen (500 μ l) wassergesättigtes Phenol (Sigma, München) und 0,2 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) (Merck, Darmstadt) hinzugefügt. Die endgültige Suspension wurde 10 Sekunden kräftig geschüttelt und anschließend 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 10000 x g und 4° C (Biofuge 17 R/S; Heraeus sepatech, Osterode). Nach diesem Zentrifugationsschritt befand sich die RNA in der wässrigen oberen Phase, die Proteine und die DNA hingegen waren in der Interphase und der unteren organischen Phase lokalisiert. Die Wasserphase wurde sehr sorgfältig quantitativ abpipettiert, ohne Protein- oder Phenolkontaminationen mitzuführen, und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Zur Fällung der RNA wurde das 2,5-fache Volumen vorgekühltem 100%igem Ethanol (Riedel-de Haen, Seelze) dazugegeben. Die Fällung erfolgte bei -70° C für 45 Minuten oder bei -20° C über Nacht. Im erstgenannten Fall wurde die anschließende Zentrifugation bei 4° C und 10000 x g für eine Dauer von 90 Minuten durchgeführt, im letzteren nur für 30 Minuten. Das erhaltene Pellet wurde in 500 μ l kaltem (-20° C) 70%igem Ethanol gewaschen und ein weiteres Mal mit 12000 x g zentrifugiert (15 min bei 4° C). Der Ethanolüberstand wurde verworfen und das Pellet vakuumgetrocknet. Die am Boden des Röhrchens getrocknete RNA wurde in 20 μ l RNase-freiem DEPC-Wasser aufgenommen. Um eine möglichst große Reinheit der RNA zu garantieren, wurde das gelöste Pellet

Letztlich wurde die gereinigte RNA in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Mit Hilfe eines Photometers (Gilford Response II™ UV-Vis Spectrophotometer) wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Die optische Dichte einer Lösung für Licht der Wellenlänge 260 nm (OD₂₆₀) ist der RNA-Konzentration direkt proportional. 1 µl der Probe wurde mit 749 µl DEPC-Wasser verdünnt und im Photometer gemessen. Die Konzentration (C) der in der Probe enthaltenen RNA läßt sich durch folgende Formel berechnen:

$$C \text{ (mg/ml)} = OD_{260} \times U \times V$$

U = Umrechnungsfaktor (40 für RNA, 50 für DNA)

V = Verdünnungsfaktor (750)

Nachdem die erhaltene RNA-Lösungen auf 2 µg/µl eingestellt worden waren, wurden sie bei -70° C aufbewahrt. Zur qualitativen Kontrolle wurde ein Teil der gewonnenen RNA in einem 1%igem Agarosegel elektroporetisch aufgetrennt.

2.12.1.5. Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Um ein möglichst geringes Probenvolumen pro Tasche mit maximalem RNA-Gehalt zu erzielen, wurden denaturierende, Formaldehyd-haltige Agarosegele im Gegensatz zur Elektrophorese mit Glyoxal und DMSO ausgewählt. Die verwendete Vorgehensweise basiert auf Methoden von Lehrbach et al., 1977; Goldberg, 1980 und Seed, 1982.

Die drei nach Detektion mit Ethiodiumbromid sichtbaren Banden repräsentieren die 28S-, 18S- und 5S-rRNA. Sie geben einerseits Aufschluß über die Integrität der RNA und sind andererseits eine Kontrolle der über die OD-Werte erfolgten Einstellung der RNA-Konzentration.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden folgende Lösungen benötigt:

1) MOPS-Puffer (10x): 200 mM 4-Morpholino-

propansulfonsäure (ICN, Meckenheim)

50 mM Natriumacetat (Merck, Darmstadt)

10 mM EDTA (Merck, Darmstadt)

2) Probenpuffer (5x):	750 µl	Formamid (deionisiert)	(ICN, Meckenheim)
	150 µl	10 x MOPS	
	240 µl	Formaldehyd, 37%ig	(Merck, Darmstadt)
	100 µl	Glycerin	(Serva, Heidelberg)
	80 µl	1% Bromphenolblau	(Sigma, Deisenhofen)
	180 µl	H ₂ O	

3) Laufpuffer: 1 x MOPS-Puffer

4) Färbelösung: 0,2% Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt)
in 0,1 M Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt)

Vor Benutzung wurden die Elektrophoresekammer, die Schlitten sowie der Kamm für 1 Stunde in 3%igem H₂O₂ sterilisiert und anschließend gründlich mit sterilem Wasser gewaschen. Für die Herstellung von 100 ml Gelvolumen wurde 1% Agarose (w/v) (Gibco, Life Technologies GmbH, Eggenstein) eingewogen und in 94 ml 1 x MOPS durch Aufkochen gelöst. Nachdem die Lösung auf 60° C abgekühlt war, wurden 5 ml 37%iges Formaldehyd (Merck, Darmstadt) unter Schütteln zugegeben. Das Gel mußte nun sofort gegossen werden.

Der RNA-Ansatz für jede Spur setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 µl Probenpuffer (5x)

10,0 µl RNA (2 µg Gesamt-RNA, in H₂O verdünnt)

Zur Denaturierung etwaiger basengepaarter Nukleotidabschnitte wurden die RNA-Proben 10 Minuten lang bei 65° C erhitzt und dann direkt auf Eis gestellt.

Der Laufpuffer wurde so hoch eingefüllt, daß er das Gel seitlich berührte, seine Oberfläche aber noch nicht bedeckte. 10 µl Probe wurden pro Spur beladen. Die Elektrophorese startete mit hoher Stromstärke (100 mA). Sobald die Proben ins Gel gelaufen waren, wurde die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese mit 4 V/cm Elektrodenabstand fortgesetzt.

Nach der ca. 3-stündigen Elektrophorese wurde das Gel je nach beabsichtigtem Verwendungszweck wie folgt weiterbehandelt:

0,1 M Ammoniumacetat entfärbt. Die Detektion der RNA erfolgte mit einem UV-Transilluminator (UV-Kontaktlampe Chroma 41; Vetter, Wiesloch) bei kurzwelligem UV-Licht (254 nm). Für das Abphotographieren der Gele wurde ein Computer-gestütztes Aufnahmesystem (Vilber Lourmat; Fröbel Labortechnik, Wasserburg) eingesetzt.

Wenn das Gel jedoch für einen Northern Blot benutzt werden sollte, wurde es nach der Elektrophorese dreimal für je 20 Minuten unter Schütteln gewässert und wie unter Material und Methoden: 2.12.1.3. beschrieben, weiterbehandelt.

2.12.1.3. Northern Blot

Der Northern Blot ist eine Methode zur vertikalen Übertragung von RNA aus einem Gel auf eine Membran, wo sie schließlich mit komplementären Nukleinsäure-Sonden hybridisieren kann. Bei der Kapillar-Transfer-Methode wandert die RNA aufgrund von Kapillarkräften mit dem Flüssigkeitsstrom aus dem Gel heraus und lagert sich auf der Membran ab (Thomas, 1980; Wahl et al., 1987). Die relativen Positionen der RNA's werden während ihres Transfers auf die Matrix beibehalten. Somit läßt sich die RNA quantitativ, qualitativ und auch von ihrer Länge her analysieren.

Für die Durchführung wurde folgender Transferpuffer benötigt:

20x SSC, pH 7,0:	3 M	NaCl	(Roth, Karlsruhe)
	300 mM	Natriumcitrat	(Roth, Karlsruhe)

Nachdem durch gründliches Wässern das Formaldehyd aus dem Gel entfernt wurde, equilibrierte das Gel 15 min in 20x SSC. Die positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim, Mannheim) wurde nach 5-minütiger Wässerung für die Dauer von 10 Minuten in 20x SSC geschüttelt. Auf eine in das Pufferreservoir aus 20x SSC eintauchende feste Unterlage wurden vier mit 20x SSC befeuchtete Lagen Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) in der Größe des Gels gelegt. Darüber folgte eine weitere Brücke, bei der jedoch die beiden Enden weit in das Reservoir hineinreichten. Nachdem auf die Brücke wiederum zwei mit 20x SSC befeuchtete Whatman-Papiere in Gelgröße gesteckt

oben) positioniert und luftblasenfrei mit der equilibrierten Membran bedeckt. Um einen Kurzschluß-Kontakt zwischen den ober- und unterhalb des Gel-Membran-Komplexes befindlichen Filterpapieren zu vermeiden, wurden die Ränder des Gels mit breiten Kunststoff-Streifen ausgelegt. Auf die Membran wurde ein etwa 10 cm hoher Stapel aus trockenen Papiertüchern plaziert, der mit einer Metallplatte und einem darauf zentral ausgerichteten Gewicht (ca. 1 kg) beschwert wurde. Der Transfer erfolgte bei 4° C über Nacht. Um die nach dem Blot immobilisierte RNA kovalent mit der Nylonmembran zu verknüpfen, wurde sie zunächst luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA-tragende Seite der Membran einer ultravioletten Strahlung (254 nm) von 1,23 J/cm² ausgesetzt (Fluo-Link,; Biometra, Göttingen). Die Lagerung der Membran geschah kurzfristig bei 4° C oder langfristig bei -20° C.

2.12.1.4. Nicht-radioaktive Hybridisierung

Hybridisierung bezeichnet generell die durch Basenpaarung bewirkte Ausbildung doppelsträngiger Nukleinsäuren aus zwei vollständig voneinander getrennten, einzelsträngigen Nukleinsäure-Molekülen. Wird durch die Reaktionsbedingungen die fehlerlose Basenpaarung zwischen den hybridisierenden Einzelsträngen gewährleistet, so spricht man von stringenten Bedingungen (McGinnis et al., 1984; Wahl et al., 1987). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierung der Northern Blot-Membranen wurden antisense RNA-Sonden benutzt. RNA/RNA-Hybride sind stabiler als RNA/DNA-Hybride (Bodkin und Knudson, 1985), so daß eine höhere Stringenz und somit eine stärkere Spezifität erreicht werden kann.

Für die Hybridisierungsreaktion wurden folgende Lösungen benötigt:

- | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1) 20x SSC, pH 7,0: | wie unter 2.12.1.3. erläutert | |
| 2) Maleinsäurepuffer, pH 7,5: | 100 mM Maleinsäure | (Merck- Schuchart, Hohenbrun) |
| | 150 mM NaCl | (Roth, Karlsruhe) |

- | | | |
|------------------------------|---|---|
| 3) Blockierungspuffer (10x): | 10% (w/v) Blockierungsreagenz
in Maleinsäurepuffer | (Boehringer,
Mannheim) |
| 4) Hybridisierungslösung: | | |
| 5x SSC mit | 2% (w/v) | Blockierungsreagenz (Boehringer,
Mannheim) |
| | 50% (v/v) | Formamid (ICN, Meckenheim) |
| | 0,1% (w/v) | N-Laurylsarkosin (Sigma, München) |
| | 0,02% (w/v) | SDS (Serva, Heidelberg) |
| | 100 µg/µl | denaturierte Lachs -
sperma DNA (Sigma, München) |
| 5) Waschlösung 1: | 2x SSC mit 0,1% SDS | (Serva, Heidelberg) |
| 6) Waschlösung 2: | 0,1x SSC mit 0,1% SDS | (Serva, Heidelberg) |

2.12.1.5. Detektion der hybridisierten RNA

Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungen wird ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-DIG Antikörper an die DIG-markierte RNA-Sonde auf der Nylonmembran gebunden. Zur Sichtbarmachung der Komplexe setzt das gebundene Antikörper-Konjugat ein Chemilumineszenz-Substrat (CDP-Star, Tropix; Boehringer Ingelheim, Heidelberg) um. Dieses wird nach enzymatischer Dephosphorylierung instabil und zerfällt unter Lichtemission. Die Belichtung eines Röntgenfilms ist dadurch möglich (Höltke et al., 1992; Dubitsky et al., 1992; Vaillancourt et al., 1992). Die Intensität der Lichtemission ist direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Enzyms und somit zur spezifischen RNA-Menge, die auf der Membran gebunden ist.

Für die Durchführung wurden folgende Reagenzien benötigt:

- 1) Waschpuffer, pH 7,5: 100 mM Maleinsäure (Merck-Schuchart, Hohenbrunn)
 150 mM NaCl (Roth, Karlsruhe)
 0,3% (v/v) Tween 20 (Serva, Heidelberg)
- 2) Reaktionspuffer: 100 mM NaCl (Roth, Karlsruhe)
 pH 9,5 100 mM Tris-HCl (Serva, Heidelberg)
 50 mM MgCl₂ (Merck, Darmstadt)
- 3) Blockierungspuffer: wie unter 2.15.1.4. erläutert
- 4) Anti-DIG-AP-Konjugat polyklonale Schaf-Anti-DIG-F_{ab}-Fragmente,
 konjugiert an alkalische Phosphatase (750 U/ml)
 (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Die hybridisierte Membran wurde 5 Minuten im Waschpuffer equilibriert und dann für 45 Minuten in 1%igem Blockierungspuffer geschüttelt. Das Antikörper-AP-Konjugat wurde 1:1500 in 1%igem Blockierungspuffer verdünnt und die Membran 45 Minuten in dieser Antikörper-Lösung inkubiert. Danach wurde sie dreimal für je 10 Minuten in Waschpuffer geschüttelt und anschließend für 3-5 Minuten in Reaktionspuffer equilibriert. Die Membran wurde für 5 min mit CDP Star bedeckt

Substrat wurde für den mehrmaligen Gebrauch wiederverwendet und im Dunkeln bei 4° C gelagert. Um eine möglichst kurzzeitige Exposition der Membran sicherzustellen, mußte die Chemiluminenszenz-Reaktion einen Gleichgewichtszustand erreicht haben. Zu diesem Zweck wurde die eingeschweißte Membran 10 Minuten bei 37° C inkubiert und erst dann einem Röntgenfilm (Hyper-Film, Amersham, Braunschweig) ausgesetzt. Die Expositionszeiten lagen zwischen 5 Sekunden und 10 Minuten. Die Entwicklung des Films erfolgte mit Fotochemikalien der Agfa-Gefaert AG (Leverkusen) (Entwickler: G 152; Fixierer. G 354).

III. Ergebnisse

1. Einfluß des Differenzierungsgrades von Monozyten auf die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation mit LPS oder Infektion mit Influenza A-Virus

1.1. Chemokin- und Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit LPS

1.1.1. Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA

Die durch Elutriation aufgereinigten Monozyten wurden in vitro durch Kultivierung in Nunc Maxisorb-Platten, in denen sie adhärirten, über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen in RPMI^{sup} + 2% AB-Serum zu Makrophagen ausdifferenziert. Nach ¼, 1, 2, 5 und 8 Tagen wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Eine nicht-stimulierte Negativkontrolle wurde mitgeführt, um unspezifisch induzierende Effekte abzugrenzen. Die Überstände wurden nach einer Inkubation von 24 Stunden gewonnen und im ELISA auf die Freisetzung verschiedener Chemokine und Zytokine untersucht.

Die Fähigkeit der Monozyten, auf den LPS-Stimulus mit einer Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen zu antworten, hing stark vom Differenzierungsgrad der Zellen ab. Die kinetische Analyse zeigte deutlich, daß eine fortschreitende Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen für die meisten der untersuchten Chemokine und Zytokine mit einer Reduktion ihrer induzierbaren Freisetzung verbunden war. Die Reduktion der induzierbaren Proteinfreisetzung konnte für die Chemokine IL-8, MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β (Abbildung 1) sowie für die Zytokine TNF- α und IL-6 (Abbildung 2) eindeutig nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde das Chemokin RANTES in vollständig ausdifferenzierten Makrophagen am stärksten induziert (Abbildung 3). Der Anstieg der RANTES-

Zytokine nicht durch einen Verlust der Zellvitalität bedingt war, sondern daß die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen mit einer Veränderung der induzierbaren Chemokin- und Zytokinexpression verbunden war. Auffallend war weiterhin die biphasisch verlaufende Induktion des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 (Abbildung 4). Nach einer anfänglichen IL-10 Produktion nach LPS-Stimulation kam es, wie bei den anderen Zytokinen, zu einer Reduktion der Freisetzung. Im weiteren Verlauf der Differenzierung zu Makrophagen stieg die LPS-induzierte Freisetzung wieder über die Ausgangswerte an.

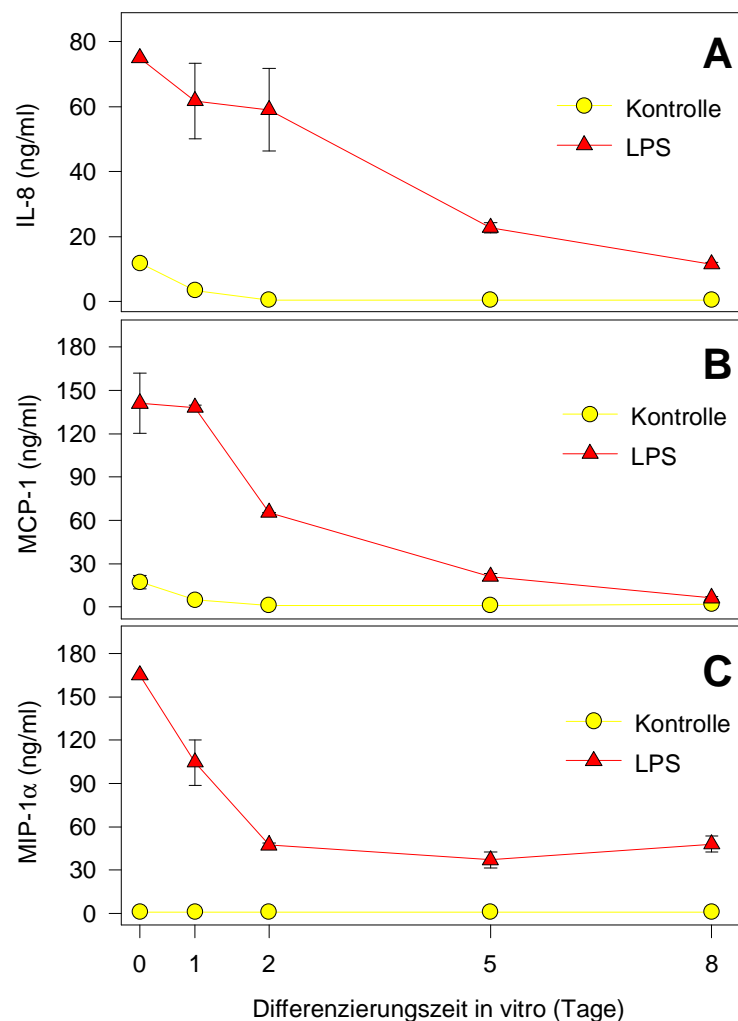


Abb.:1 Kinetik der Chemokinfreisetzung humaner Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades. Kultivierte Monozyten wurden nach Differenzierungsphasen von 1/4, 1, 2, 5 und 8 Tagen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Als Negativkontrollen dienten nicht stimulierte Monozytenkulturen. Die Überstände wurden nach 24 Stunden gewonnen. Durch ELISA erfolgte die Bestimmung der freigesetzten Chemokine IL-8, MCP-1 und MIP-1α.

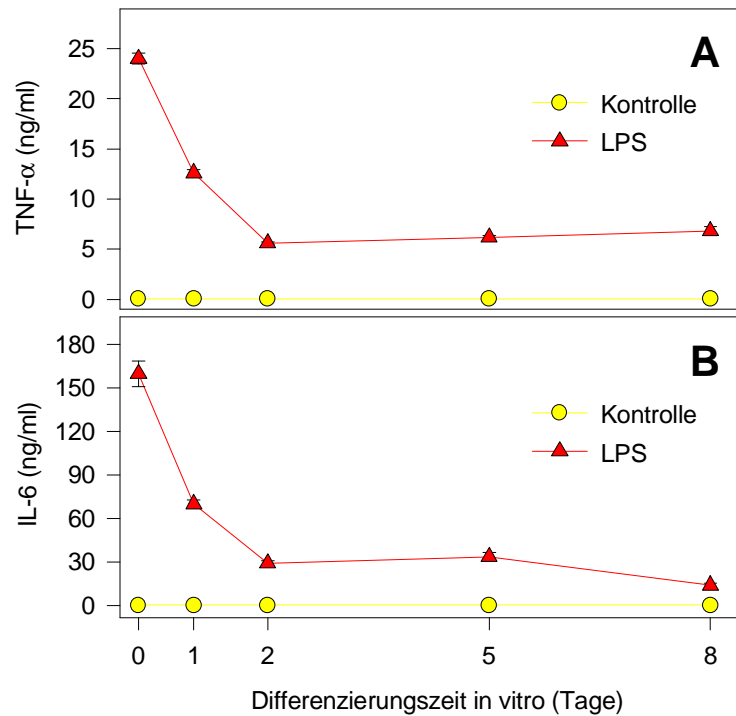


Abb.:2 Kinetik der Zytokinfreisetzung humaner Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades. Humane Monozyten wurden entweder direkt nach Elutriation oder zu den angegebenen Zeitpunkten nach in vitro Differenzierung mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Als Negativkontrollen dienten nicht-stimulierte Monozytenkulturen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und die Freisetzung von TNF- α und IL-6 in spezifischen ELISA's bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

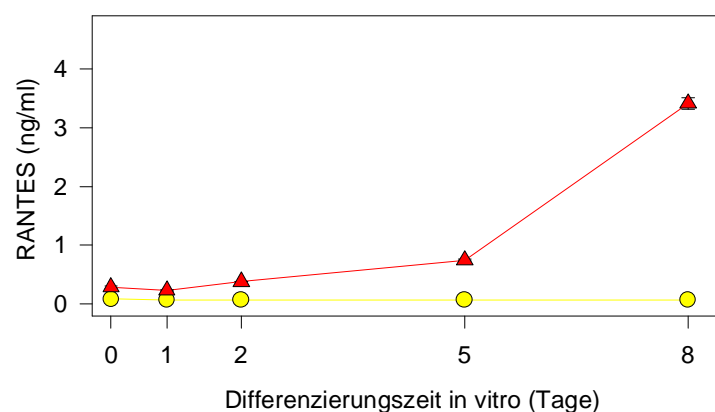


Abb.:3 Kinetik der RANTES-Freisetzung humaner Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades. In vitro differenzierte Monozyten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nicht-behandelte Monozytenkulturen dienten als Negativkontrolle. Die konditionierten Überstände wurden nach 24 Stunden gewonnen. Durch ELISA erfolgte die Bestimmung der freigesetzten RANTES-Menge. Dargestellt sind die MW \pm SD eines

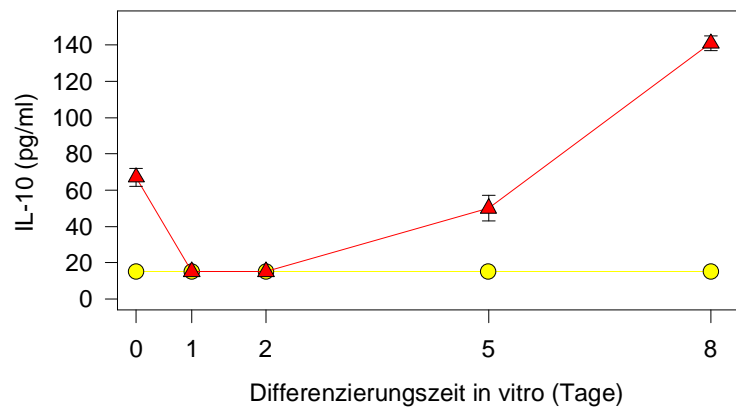


Abb.:4 Kinetik der IL-10-Freisetzung humaner Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades.

Durch Elutriation aufgereinigte Monozyten wurden unter in vitro Bedingungen zu Makrophagen ausdifferenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml LPS über einen Zeitraum von 24 Stunden. Als Negativkontrollen dienten nicht-stimulierte Monozytenkulturen. Die Bestimmung der freigesetzten IL-10-Menge erfolgte im ELISA. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

1.1.2. Analyse der Chemokin mRNA-Expression

Für die Northern Blot-Analysen wurden durch Elutriation gereinigte Monozyten unter in vitro Bedingungen über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen kultiviert. Nach ¼, 1, 2, 5 und 8 Tagen wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Um unspezifisch induzierende Effekte abgrenzen zu können, wurde zu jedem Zeitpunkt eine nicht-stimulierte Zellkultur als Negativkontrolle mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden wurden die Zellen lysiert, die RNA präpariert und anschließend die spezifische mRNA-Expression mit Hilfe DIG-markierter Riboprobes analysiert.

Die veränderte Proteinfreisetzung der Monozyten in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad wurden durch die Analysen der mRNA-Expression bestätigt. Auch hier zeigte sich, daß mit zunehmender Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen eine Reduktion der LPS-induzierten MCP-1- und IL-8-Genexpression eintrat. Im Gegensatz dazu erreichte die RANTES-Genexpression erst in ausdifferenzierten Makrophagen einen Höhepunkt (Abbildung 5).

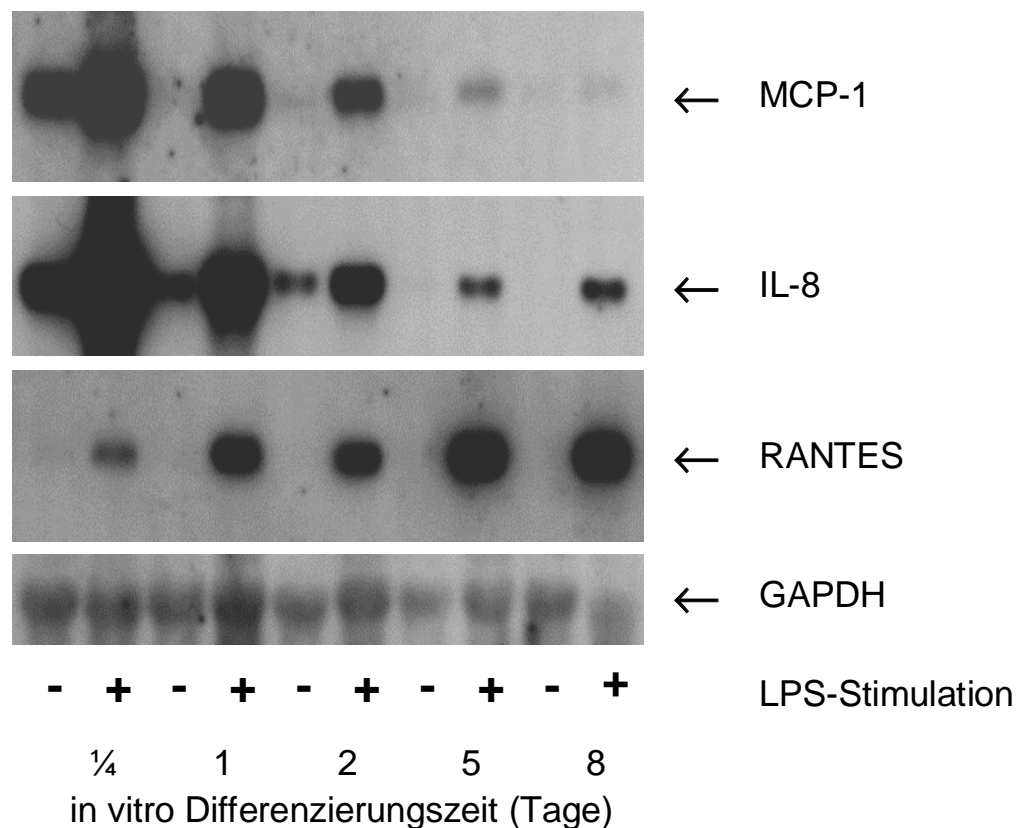


Abb.:5 Analyse der Genexpression humaner Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades.

Kultivierte Monozyten wurden nach Differenzierungsphasen von 1/4, 1, 2, 5 und 8 Tagen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Als Negativkontrollen wurden nicht-behandelte Zellkulturen mitgeführt. Die Zellen wurden nach 8 Stunden lysiert und die RNA präpariert. Anschließend wurde die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Expression von IL-8, MCP-1 und RANTES mit Hilfe spezifischer, DIG-markierter Riboprobes im Northern Blot analysiert. Als Kontrolle für mengenmäßig gleich eingesetzte RNA diente das konstitutiv exprimierte Gen für das Enzym GAPDH. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse eines repräsentativen Spenders von drei untersuchten Spendern.

1.1.3. Funktionelle Analyse der differentiellen Chemokinfreisetzung im Chemotaxisassay

Weiterhin bestätigt wurde die Reduktion der Chemokinfreisetzung in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Monozyten durch die funktionelle Analyse der LPS-induzierten Überstände. Wie sich im Chemotaxisassay zeigte, trat eine Reduktion der durch LPS induzierbaren chemotaktischen Aktivitäten auf, die mit dem Differenzierungsgrad der Zellen korrelierte.

Hierfür wurden elutrierte Monozyten zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten mit 10 ng/ml LPS stimuliert und die nach 24 Stunden freigesetzten Monozyten-spezifischen oder Neutrophilen-spezifischen chemotaktischen Aktivitäten im Chemotaxisassay analysiert. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich die Überstände nicht-stimulierter Zellen eingesetzt (Abbildung 6). Wie sich deutlich zeigte, trat bei den Überständen der über 8 Tage differenzierten Makrophagen eine Reduktion der freigesetzten chemotaktischen Aktivitäten auf. Diese Reduktion betraf sowohl die Freisetzung von CXC-Chemokinen, die vor allem auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirken, als auch die Freisetzung von CC-Chemokinen, die vor allem mononukleäre Zellen aktivieren.

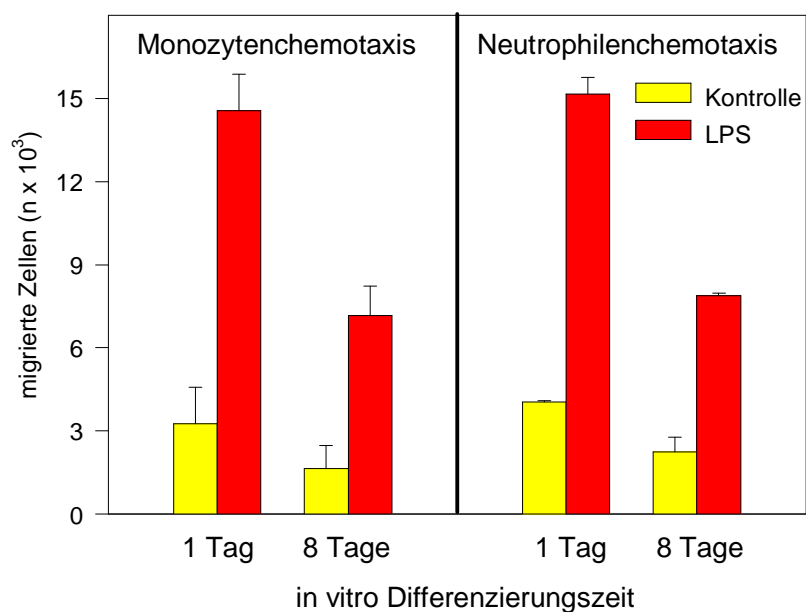


Abb.:6 Freisetzung von chemotaktischen Aktivitäten nach Stimulation mit LPS durch humane Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades. Elutrierte Monozyten wurden in vitro unter Adhärenzbedingungen zu Makrophagen differenziert. Nach 1 Tag und 8 Tagen wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Eine nicht-behandelte Kultur diente jeweils als Negativkontrolle. Nach 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und im Chemotaxisassay auf ihre Monozyten-spezifischen oder Neutrophilen-spezifischen chemotaktischen Aktivitäten analysiert. Die Anzahl der migrierten Zellen als Antwort auf diese konditionierten Überstände wurde densitometrisch (Monozyten) oder enzymatisch (Neutrophile) bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD von vier unabhängigen Ansätzen eines repräsentativen Spenders.

1.2. Chemokin- und Zytokinfreisetzung nach Infektion mit Influenza A/PR/8

1.2.1. Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA

Die durch Elutriation aufgereinigten und unter Adhärenzbedingungen über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen differenzierten Makrophagen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten ($\frac{1}{4}$, 1, 2, 5 und 8 Tage) mit 2 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Als Negativkontrollen dienten nicht-stimulierte Monozytenkulturen. Die Überstände wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden gewonnen und im ELISA auf die spezifische Freisetzung verschiedener Chemokine und Zytokine untersucht.

Die Fähigkeit der Monozyten zur veränderten Chemokin- und Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades zeigte sich auch bei der Infektion der Zellen mit Influenza A/PR/8-Virus. Auch hierbei konnte festgestellt werden, daß mit zunehmender Differenzierung eine Reduktion der Freisetzung der meisten nach Virusinfektion induzierten Chemokine und Zytokine stattfand (Abbildung 7A). Die Infektion der Zellen mit A/PR/8 induzierte reproduzierbar keine signifikante Produktion von IL-8 (Abbildung 7B). Ähnlich wie bei der Stimulation der Zellen mit LPS zeigte sich aber auch bei der Infektion mit A/PR/8, daß RANTES in vollständig ausdifferenzierten Makrophagen am stärksten induzierbar war (Abbildung 8).

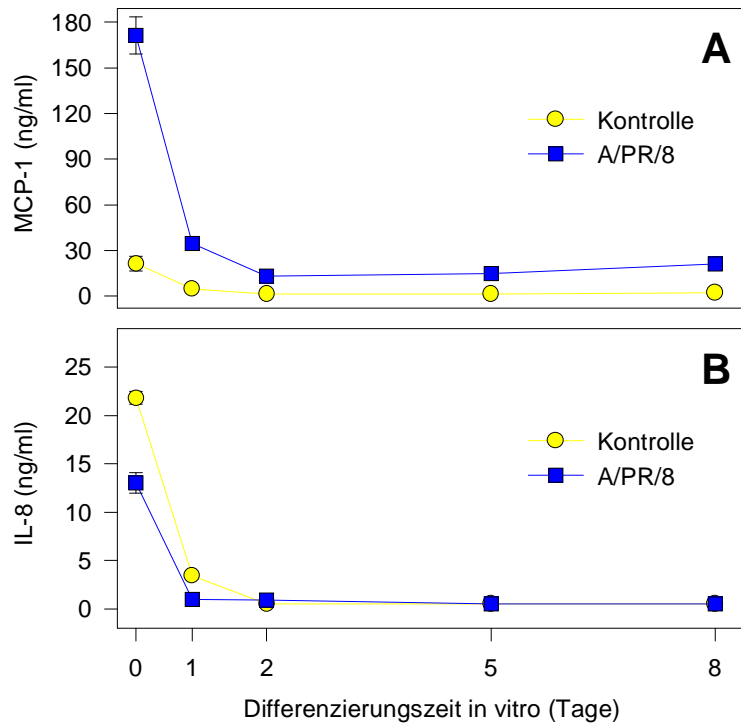


Abb.:7 Kinetik der Chemokinfreisetzung nach Influenza Infektion durch humane Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades. Nach Differenzierungsphasen von ¼, 1, 2, 5 und 8 Tagen wurden humane Monozyten mit 2 MOI A/PR/8 infiziert und die konditionierten Überstände nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden gewonnen. Zur Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellkulturen mitgeführt. Durch ELISA erfolgte die Bestimmung der freigesetzten Chemokine IL-8 und MCP-1. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

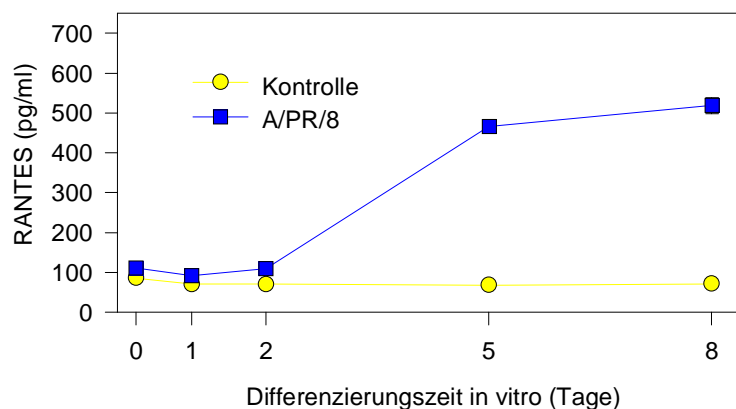


Abb.:8 Kinetik der RANTES-Freisetzung nach Influenza Infektion durch humane Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades. Humane Monozyten wurden nach Differenzierungsphasen von ¼, 1, 2, 5 und 8 Tagen mit A/PR/8 infiziert und die induzierten Überstände nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden geerntet. Nicht-infizierte Zellkulturen dienen als Negativkontrolle. Die

1.2.2. Funktionelle Analyse der differentiellen Chemokinfreisetzung im Chemotaxisassay

Wie schon für die Stimulation von Monozyten mit LPS gezeigt werden konnte, führte auch die Infektion mit Influenza-Viren zu einer vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängigen Reduktion der Freisetzung von CC-Chemokinen, die durch die funktionelle Analyse der Virus-induzierten Überstände bestätigt werden konnte. Die Infektion der Monozyten mit A/PR/8 bewirkte zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung eine Freisetzung von CXC-Chemokinen.

Die zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten nach Influenza-Infektion induzierten chemotaktischen Aktivitäten wurden im funktionellen Chemotaxisassay analysiert (Abbildung 9). Wie sich deutlich zeigte, trat bei den Überständen der über 8 Tage differenzierten Zellen eine Verminderung der freigesetzten Monozyten-spezifischen chemotaktischen Aktivitäten auf. Im Gegensatz dazu wurden durch eine Infektion der Zellen mit A/PR/8 keine signifikante Freisetzung von Neutrophilen-spezifischen Chemokinen beobachtet.

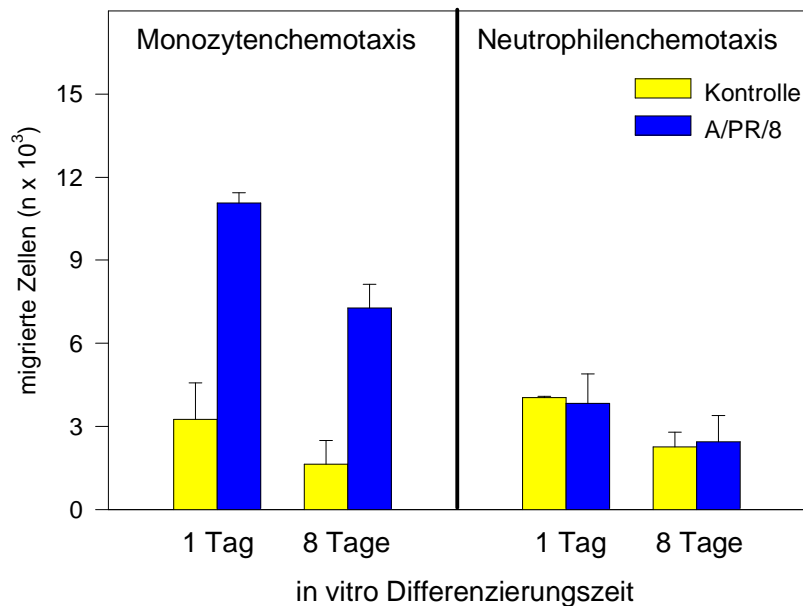


Abb.:9 Freisetzung von chemotaktischen Aktivitäten nach Influenza-Infektion durch humane Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades.
Die unter in vitro Bedingungen kultivierten Monozyten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine nicht-infizierte Kultur mitgeführt. Die Überstände wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden gewonnen und im Chemotaxisassay auf ihre Monozyten-spezifischen und Neutrophilen-spezifischen chemotaktischen Aktivitäten untersucht. Die Anzahl der migrierten Zellen als Antwort auf diese konditionierten Überstände wurde densitometrisch (Monozyten) oder enzymatisch (Neutrophile) bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD von drei unabhängigen Ansätzen eines repräsentativen Spenders.

Die wichtigsten Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden: die Fähigkeit von Monozyten zur Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen war in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen verändert. Bei den meisten untersuchten Chemokinen und Zytokinen trat eine deutliche Reduktion der Freisetzung nach Stimulation der Zellen auf. Eine Ausnahme zeigte sich jedoch bei der Freisetzung von RANTES, das mit zunehmender Differenzierung verstärkt exprimiert wurde. Die gesteigerte RANTES-Produktion war jedoch nicht ausreichend, um die Reduktion der anderen CC-Chemokine im funktionellen Monozytenchemotaxisassay zu kompensieren.

2. Toleranzinduktion in primären humanen Monozyten

2.1. Toleranzinduktion in humanen Monozyten durch LPS

2.1.1. Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA

Die durch Elutriation aufgereinigten Monozyten wurden in vitro unter Adhärenzbedingungen in RPMI^{sup} + 2% AB-Serum kultiviert und mit verschiedenen LPS-Dosen stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Anschließend erfolgte die Restimulation der Zellen mit einer höheren, zweiten LPS-Gabe. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und im ELISA auf die Freisetzung spezifischer Chemokine und Zytokine untersucht.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich eine differentielle Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinexpression nach der Vorbehandlung der Zellen mit LPS. Bei den Zytokinen TNF- α und IL-6 trat eine von der Höhe des ersten Stimulus abhängige Suppression der Freisetzung im Anschluß an die Restimulation auf (Abbildung 10). Ebenfalls supprimiert wurde in diesem System die Freisetzung der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu zeigte sich die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 unbeeinflusst bzw. abhängig von der Höhe der Vorstimulation, sogar erhöht (Abbildung 12).

Das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 zeigte kein einheitliches Verhalten in den Desensibilisierungsversuchen. Bei ca. 80% der untersuchten Spender zeigte sich eine Suppression der IL-10-Produktion in Abhängigkeit von der Höhe des ersten LPS-Stimulus. Ca. 20% der Spenderzellen zeigten im Gegensatz dazu keine Verminderung der Freisetzung nach der Restimulation mit LPS. Häufig trat bei diesen Spendern sogar eine erhöhte Freisetzung in Abhängigkeit von der Höhe der Vorstimulation auf.

Auffallend war weiterhin, daß es bei den nicht restimulierten Kontrollzellen zu keiner signifikanten Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen mehr kam.

Eine Beeinflussung der Freisetzung der supprimierten Chemokine und Zytokine

ausgeschlossen werden. Im ELISA zeigte sich, daß es zu keiner intrazellulären Anreicherung der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES oder den Zytokinen TNF- α , IL-6 und IL-10 in den restimulierten Zellen kam (Daten nicht gezeigt).

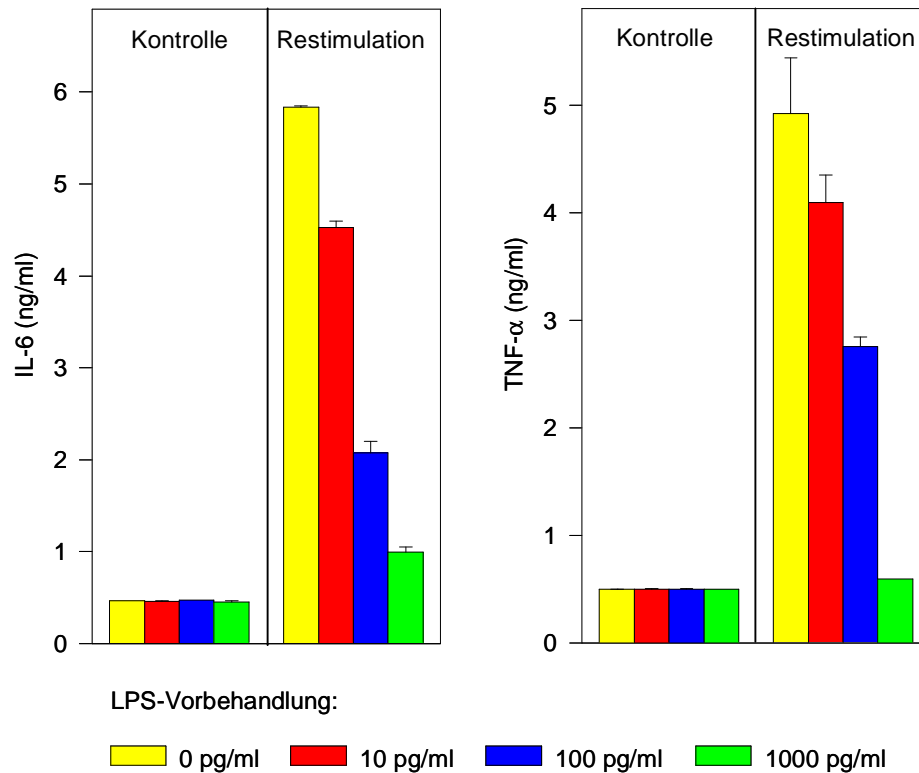


Abb.:10 Desensibilisierung der Freisetzung von Zytokinen durch LPS. Die elutrierten Monozyten wurden mit verschiedenen LPS-Dosen (0 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml und 1000 pg/ml) über einen Zeitraum von 2 Tagen vorstimuliert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Überstand gewechselt und die Zellen anschließend mit einer höheren, zweiten LPS-Gabe (10 ng/ml) über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle für eine durch den ersten Stimulus induzierte Freisetzung wurden nicht restimulierte Zellkulturen mitgeführt. Die Überstände wurden geerntet und im ELISA auf die spezifische Freisetzung von TNF- α und IL-6 analysiert. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

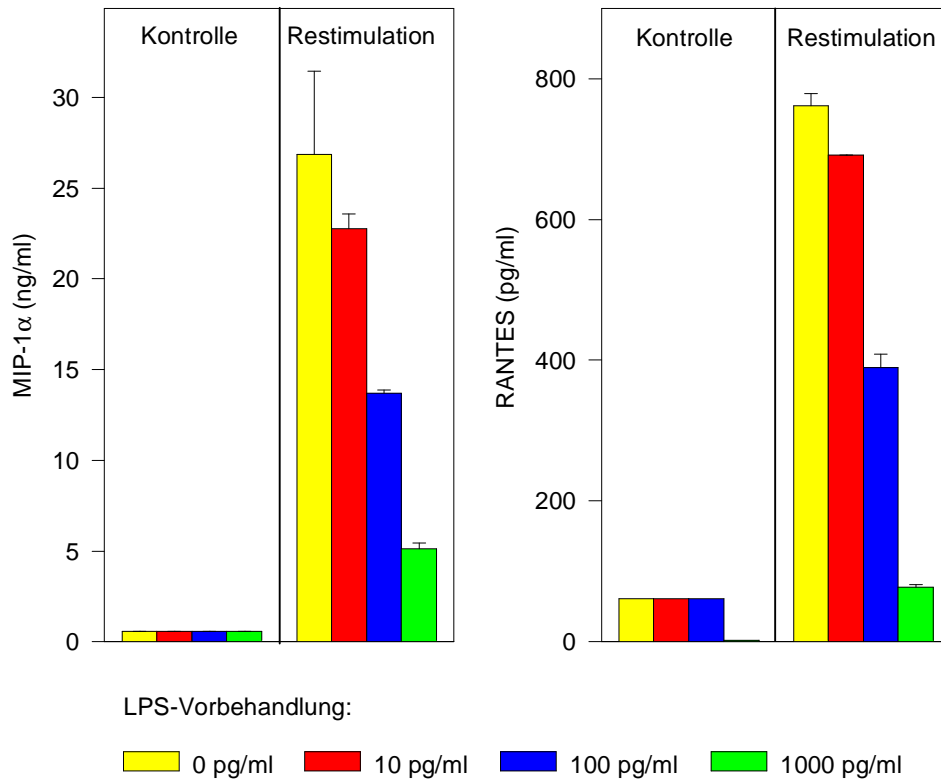


Abb.:11 Desensibilisierung der Freisetzung von Chemokinen durch LPS. Humane Monozyten wurden nach Elutriation unter in vitro Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit verschiedenen LPS-Dosen (0 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml und 1000 pg/ml) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurden die Überstände entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Im Anschluß erfolgte die Restimulation der Zellen mit 10 ng/ml LPS. Um den Effekt der ersten Stimulation abgrenzen zu können, wurden nicht-restimierte Zellkulturen mitgeführt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen. Die Bestimmung der induzierten Chemokine MIP-1α und RANTES erfolgte im ELISA. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

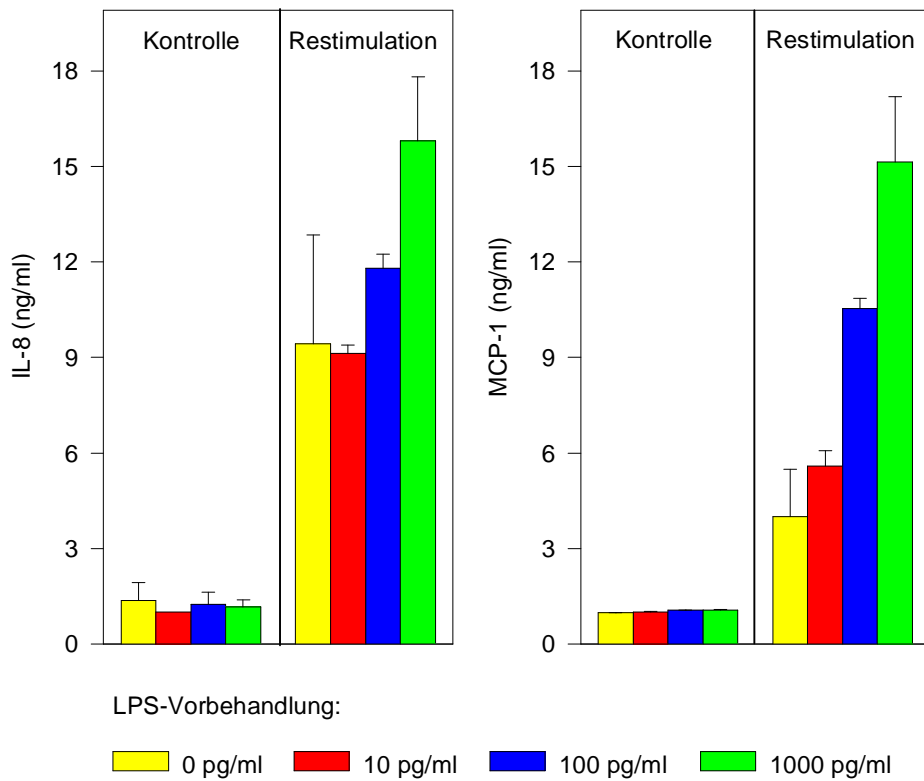


Abb.:12 Die Freisetzung einiger Chemokine ließ sich durch LPS nicht desensibilisieren. Isolierte Monozyten wurden über einen Zeitraum von 2 Tagen mit 0 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml und 1000 pg/ml LPS vorstimuliert. Anschließend wurden die Überstände durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit 10 ng/ml LPS restimuliert. Zur Kontrolle der durch den ersten Stimulus induzierten Freisetzung wurden Zellkulturen ohne Restimulation mitgeführt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und auf die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 mit Hilfe von ELISA-Techniken untersucht. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

Um die differentielle Desensibilisierung der Chemokinfreisetzung kinetisch zu untersuchen, wurden Monozyten nach Elutriation zu verschiedenen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS vorstimuliert. Anschließend erfolgte die Restimulation der Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 10 ng/ml.

Weiterhin wurde bei diesen Versuchen die Vorstimulation der Zellen bis zu einer LPS-Dosis von 10 ng/ml durchgeführt. Damit sollte sichergestellt werden, daß die beobachtete fehlende Desensibilisierung der Freisetzung einiger Chemokine nicht auf eine zu geringe Vorstimulation der Zellen zurückzuführen war.

Für die Auswertung dieser Versuche wurde die relative Chemokin- bzw. Zytokinfreisetzung der restimulierten Zellen, bezogen auf die Freisetzung der nicht vorstimulierten, nur mit dem zweiten LPS-Stimulus behandelten Zellen, dargestellt.

Die Auswertung dieser Versuche ergab eine starke, über den ganzen Untersuchungszeitraum anhaltende Suppression der Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit von der Höhe der Vorstimulation der Zellen (Abbildung 13). Dieser Effekt trat bei den Chemokinen, die eine Toleranzinduktion zeigten, vergleichsweise verzögert auf. Des weiteren wurden für die Induktion der Toleranz höhere LPS-Dosen benötigt als für Zytokine (Abbildung 14). Auch bei diesen Versuchen mit einer Vorstimulation mit Dosen bis zu 10 ng/ml zeigte sich, daß die Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 nicht desensibilisierbar waren. Vor allem für GRO- α und MCP-1 konnte eine verstärkte Freisetzung der Proteine in Abhängigkeit von der Höhe der Vorstimulation beobachtet werden (Abbildung 15).

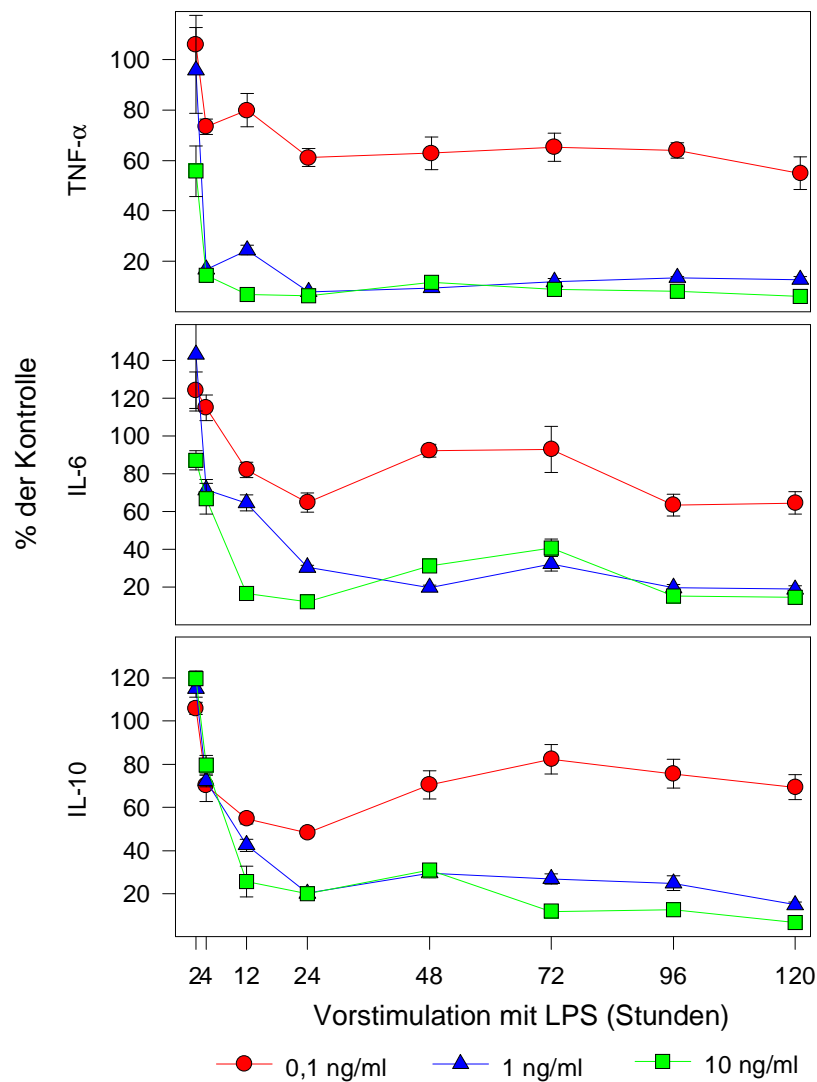


Abb.:13 Desensibilisierung der Freisetzung von Zytokinen durch LPS: Kinetische Analyse. Durch Elutriation aufgereinigte humane Monozyten wurden über die angegebenen Zeiträume mit steigenden LPS-Konzentrationen vorstimuliert. Anschließend wurden die Überstände durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit einer Dosis von 10 ng/ml LPS restimuliert. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und die Freisetzung der Zytokine im ELISA ermittelt. Für die Auswertung wurde die Menge der freigesetzten Zytokine restimulierter Zellen auf die Freisetzung nicht-vorstimulierter Zellen bezogen. Die Ergebnisse sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

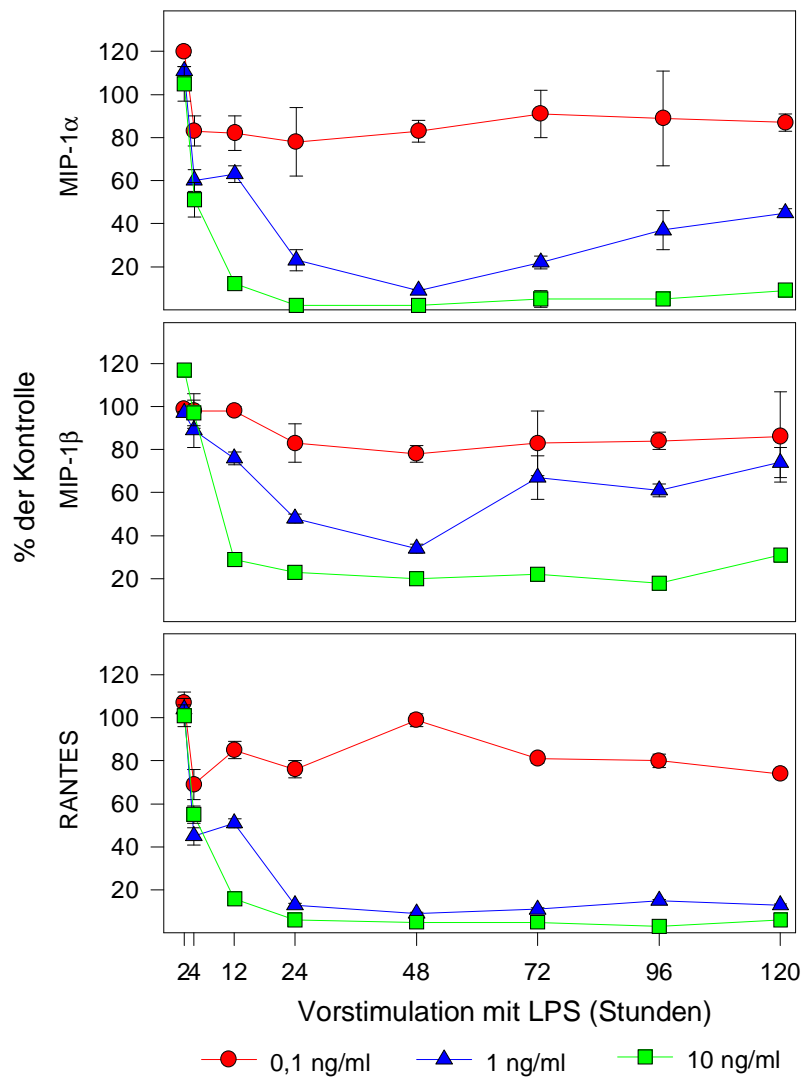


Abb.:14 Kinetik der Desensibilisierung von Chemokinen durch LPS. Humane Monozyten wurden über die angegebenen Zeiträume mit verschiedenen LPS-Dosen vorinkubiert. Die Überstände wurden entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Im Anschluß wurden die Zellen mit einer zweiten LPS-Dosis von 10 ng/ml restimuliert und die über einen Zeitraum von 24 Stunden konditionierten Überstände mit Hilfe von ELISA's auf die Freisetzung der zu untersuchenden Chemokine analysiert. Für die Auswertung wurde die Menge der freigesetzten Chemokine restimulierter Zellen auf die Freisetzung nicht-vorstimulierter Zellen bezogen. Die Ergebnisse sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

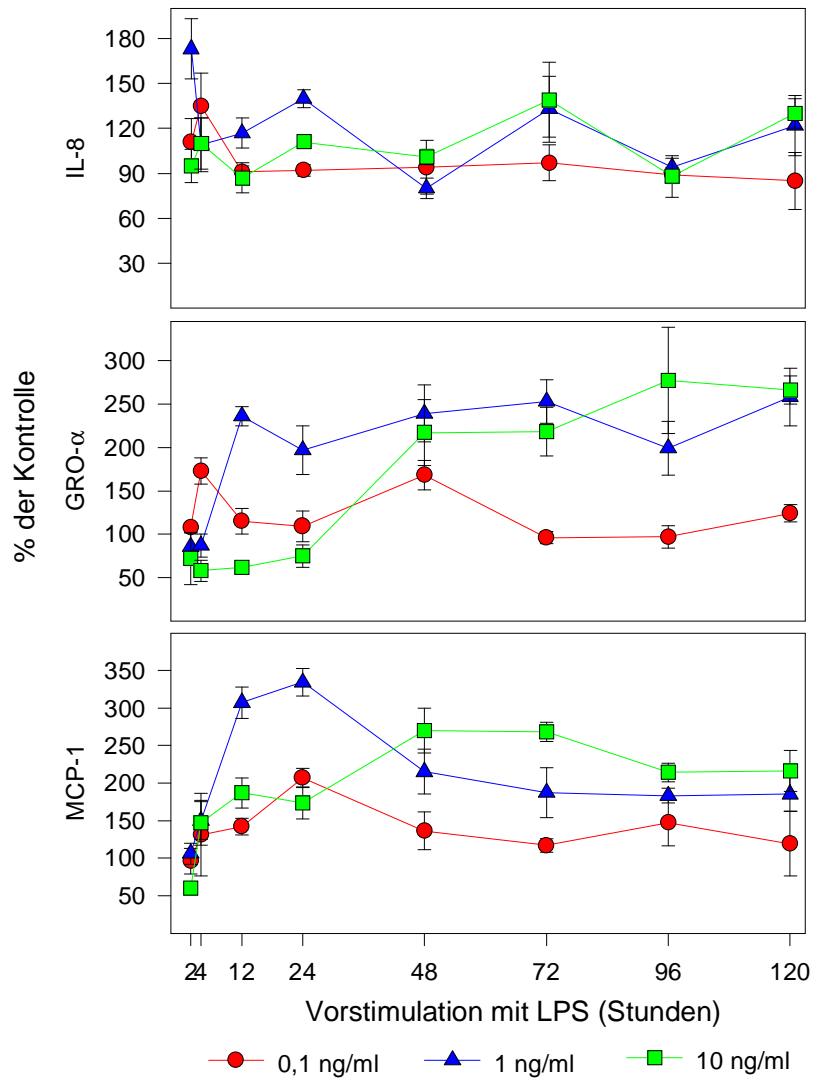


Abb.:15 Verstärkte Freisetzung einiger Chemokine nach Vorstimulation mit LPS. Humane Monozyten wurden über die angegebenen Zeiträume mit steigenden LPS-Konzentrationen vorinkubiert. Anschließend wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit einer weiteren LPS-Gabe von 10 ng/ml restimuliert. Nach 24 Stunden wurden die konditionierten Überstände abgenommen und die Freisetzung der Chemokine in spezifischen ELISA's untersucht. Für die Auswertung wurde die Menge der freigesetzten Chemokine restimulierter Zellen auf die Freisetzung nicht-vorstimulierter Zellen bezogen. Die Ergebnisse sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

2.1.2. Analyse der Chemokin- und Zytokin-mRNA-Expression nach Toleranzinduktion durch LPS

Für die Northern Blot-Analysen wurden humane Monozyten über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden LPS-Konzentrationen vorstimuliert. Anschließend wurde der Überstand gewechselt und die Zellen mit einer zweiten LPS-Gabe restimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert. Anschließend erfolgte die Analyse der spezifischen mRNA-Expression mit Hilfe DIG-markierter Riboprobes.

Die differentielle Desensibilisierung der humanen Monozyten in Abhängigkeit der LPS-Vorstimulation konnte durch die Analysen der mRNA Expression bestätigt werden. Auch hier zeigte sich eine Induktion von Toleranz, die mit der Höhe der LPS-Vorstimulation korrelierte. Repräsentativ wurde die Expression der TNF- α - und der MIP-1 α -mRNA analysiert, für die sich eine deutlich reduzierte Stimulierbarkeit nach Vorstimulation mit LPS fand. Wie schon auf Proteinebene gezeigt werden konnte, war die mRNA-Expression von MCP-1 und IL-8 im Gegensatz dazu nicht desensibilisierbar. Hier zeigte sich eine unveränderte bzw. induzierte mRNA-Expression (Abbildung 16).

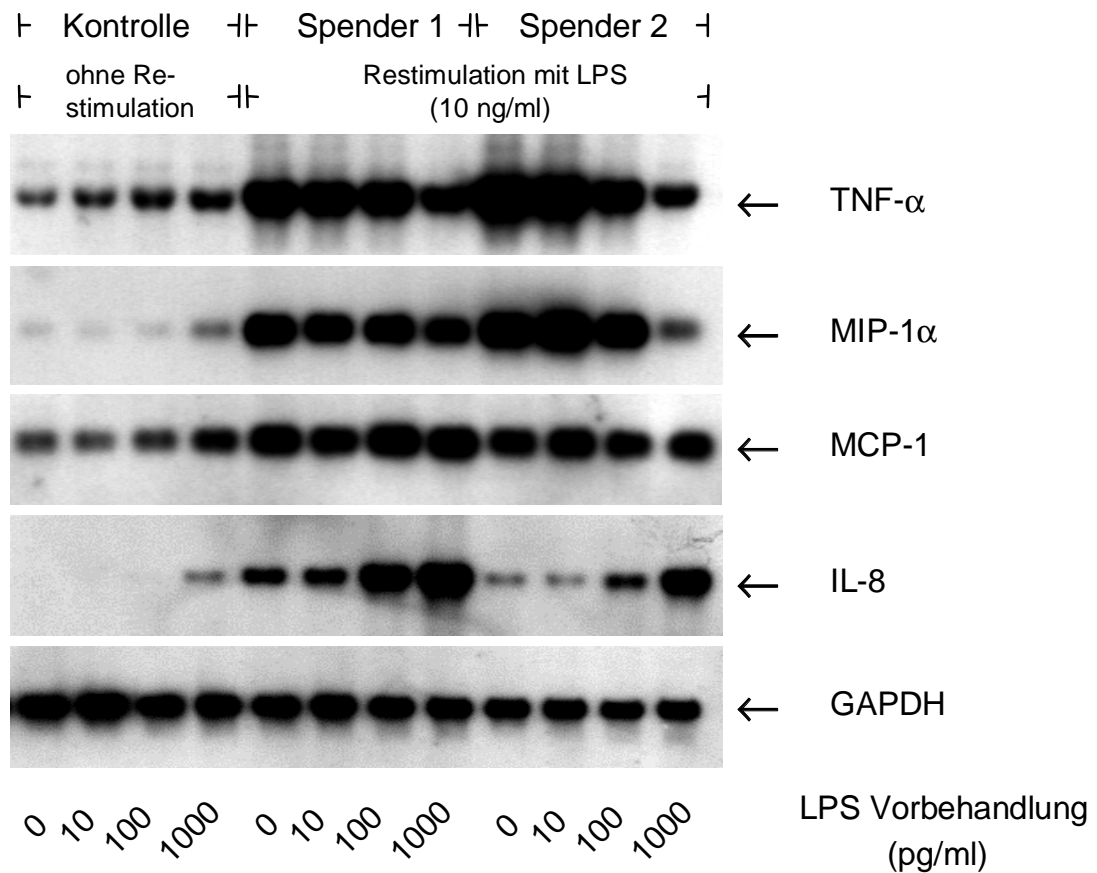


Abb.:16 Differentielle Desensibilisierung der Genexpression in Monozyten durch LPS. Humane Monozyten wurden für einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml und 1000 pg/ml) vorstimuliert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Überstand gewechselt und die Zellen anschließend mit einer Dosis von 10 ng/ml LPS restimuliert. Als Kontrolle für eine durch den ersten Stimulus induzierte mRNA-Expression wurden nicht-restimulierte Kontrollzellen mitgeführt. Die Zellen wurden nach einer weiteren Inkubationszeit von 8 Stunden lysiert und die RNA isoliert. Anschließend wurde die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Expression von TNF- α , MIP-1 α , MCP-1 und IL-8 mit Hilfe spezifischer, DIG-markierter Riboprobes im Northern Blot analysiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Auftragung der RNA diente das konstitutiv exprimierte Gen für das Enzym GAPDH. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 repräsentativen Spendern. Die Ergebnisse der mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde beim zweiten Spender nicht dargestellt.

2.1.3. Funktionelle Analyse des Einflusses einer differentiellen Desensibilisierung der Chemokinfreisetzung im Chemotaxisassay

Weiterhin wurde die differentielle Desensibilisierung der Chemokinfreisetzung bei einer Vorstimulation der Zellen mit LPS durch die funktionelle Analyse der freigesetzten chemotaktischen Aktivitäten im Chemotaxisassay bestätigt.

Wie zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit noch ausführlich erläutert wird (siehe Ergebnisse, 7.2.1. Einfluß des Differenzierungsgrades auf das Migrationsverhalten der Monozyten), kommt es während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zu einer Veränderung des chemotaktischen Verhaltens. Es konnte gezeigt werden, daß Monozyten besonders durch MCP-1, Makrophagen im Gegensatz dazu vor allem durch MIP-1 α in verstärktem Maße chemotaktisch angelockt werden.

Frisch isolierte humane Monozyten reagierten unverändert gut auf die nach Toleranzinduktion freigesetzten Aktivitäten in den Überständen (Abbildung 17A). Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtung, daß die Freisetzung von MCP-1 nicht durch eine Vorstimulation mit LPS supprimiert werden konnte, da Monozyten besonders auf MCP-1 mit einer stark ausgeprägten Chemotaxis antworten. Im Gegensatz dazu zeigte sich das chemotaktische Verhalten von differenzierten Makrophagen als Antwort auf die Toleranz-induzierte Überstände deutlich supprimiert, da die LPS-Vorstimulation der Zellen eine Suppression der MIP-1 α -Freisetzung induzierte (Abbildung 17B).

Außerdem zeigte sich im chemotaktischen Verhalten von neutrophilen Granulozyten als Antwort auf die Toleranz-induzierten Überstände keine Veränderungen (Abbildung 17C). Dieses Ergebnis bestätigt die gefundene Beobachtung, daß die Chemokine IL-8 und GRO- α durch eine Vorstimulation der Zellen nicht desensibilisiert werden konnten.

Für die Chemotaxisversuche wurden Monozyten über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden LPS-Konzentrationen inkubiert. Im Anschluß wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit einer zweiten LPS-Stimulation behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und auf die

induzierten Monozyten-spezifischen und Neutrophilen-spezifischen chemotaktischen Aktivitäten im Chemotaxisassay analysiert.

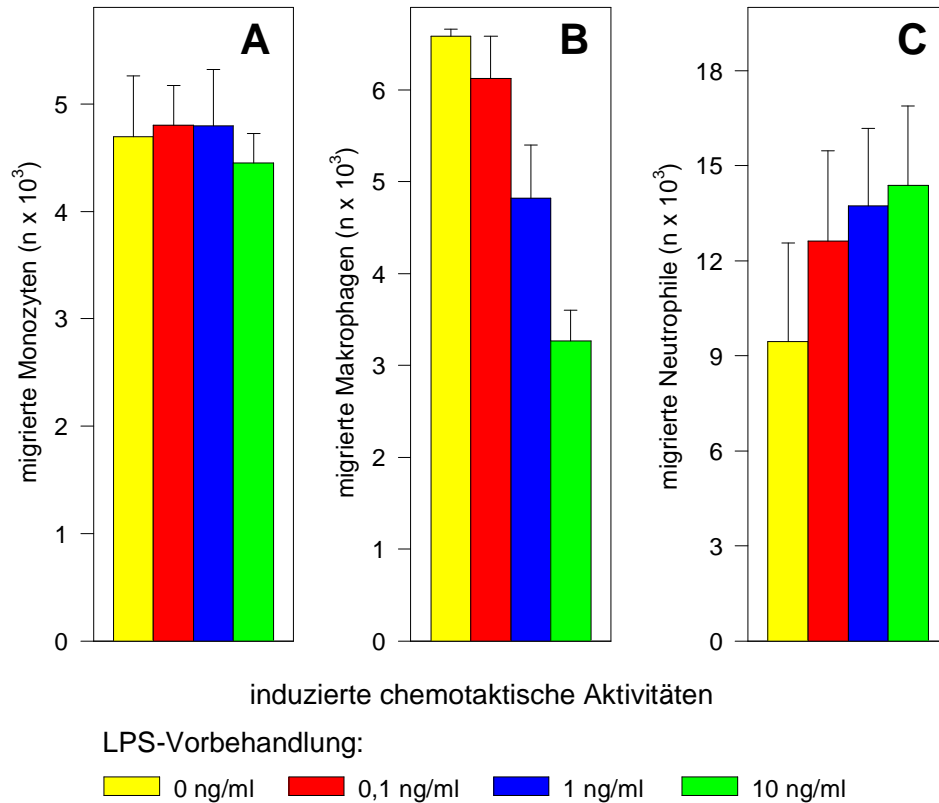


Abb.:17 Funktionelle Analyse des Einflusses einer Vorstimulation mit LPS.

Isolierte Monozyten wurden unter Adhärenzbedingungen über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml) vorstimuliert. Anschließend wurde der Überstand gewechselt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit 10 ng/ml LPS restimuliert. Die konditionierten Überstände wurden nach 24 Stunden geerntet und im Chemotaxisassay auf die induzierten Monozyten-spezifischen, Makrophagen-spezifischen und Neutrophilen-spezifischen chemotaktischen Faktoren untersucht. Die Anzahl der auf die Toleranz-induzierten Überstände migrierten Zellen wurde densitometrisch (Monozyten/Makrophagen) oder enzymatisch (Neutrophile) bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD von vier unabhängigen Ansätzen eines repräsentativen Spenders.

2.1.4. Einfluß von PMA und Zymosan auf die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen in Toleranz-induzierten humanen Monozyten

Für den Nachweis einer selektiven Desensibilisierung der Zellen durch LPS wurden vorstimulierte Zellen mit PMA oder Zymosan restimuliert. Hierdurch sollte untersucht werden, ob der beobachtete Effekt der differentiellen Desensibilisierung LPS-spezifisch war. Außerdem sollte eine refraktäre Phase durch die Erschöpfung der Zellen nach der ersten LPS-Stimulation ausgeschlossen werden.

Hierzu wurden humane Monozyten mit steigenden LPS-Konzentrationen über einen Zeitraum von 2 Tagen vorstimuliert und anschließend mit PMA oder Zymosan (Abbildung 18) restimuliert. Als Kontrolle wurde gleichzeitig eine Restimulation mit LPS durchgeführt.

Die Auswertung dieser Versuche zeigte eine unbeeinflusste Freisetzung aller untersuchten Chemokine und Zytokine nach einer Restimulation der Zellen mit PMA oder Zymosan. Die Freisetzung der Proteine lagen immer im Bereich der nicht-vorstimulierten Kontrollzellen. Für die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1, die sich durch LPS-Behandlung nicht desensibilisieren ließen, zeigte sich eine von der Höhe der Vorstimulation abhängige Induktion der Proteinsynthese. Diese Ergebnisse sprachen für eine LPS-spezifische differentielle Desensibilisierung. Eine refraktäre Phase der Zellen nach der ersten LPS-Stimulation konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

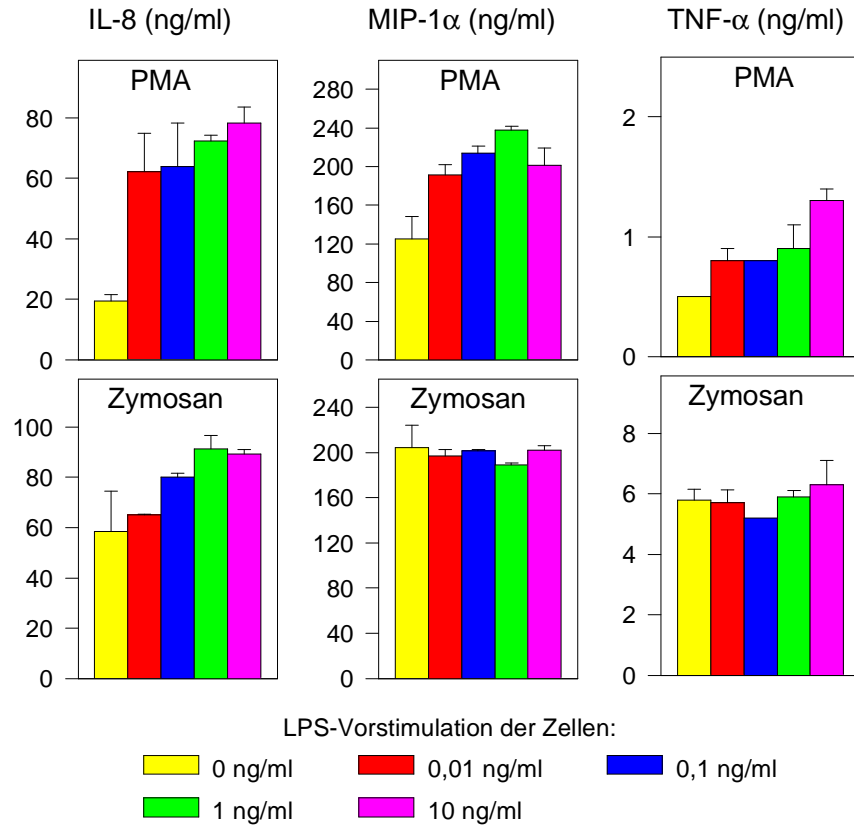


Abb.:18 Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Restimulation LPS-vorstimulierter Zellen mit PMA oder Zymosan. Kultivierte Monozyten wurden über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml) vorstimuliert. Anschließend wurden die Überstände entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Die Restimulation der Zellen erfolgte mit PMA (10 ng/ml) oder Zymosan (15 Partikel/Monozyt) über 24 Stunden. Die gewonnenen Überstände wurden in spezifischen ELISA's untersucht. In der Abbildung ist exemplarisch aus jeder Gruppe der unterschiedlichen Restimulationen ein Vertreter dargestellt. Die Werte entsprechen den MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

2.2. Toleranzinduktion in humanen Monozyten durch IL-10

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, führte eine Vorbehandlung humaner Monozyten zu einer differentiellen Desensibilisierung von inflammatorischen Zytokinen und einer Gruppe von Chemokinen nach einer zweiten Stimulation mit LPS. Im Gegensatz dazu zeigten die Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 keine supprimierte Expression nach einer wiederholten LPS-Stimulation. Die für diesen Effekt verantwortlichen Mediatoren sollten in den folgenden Versuchen eingegrenzt werden. Insbesondere wurde hierbei das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 als ein möglicher indirekter suppressiver Mediator analysiert.

2.2.1. Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA

Für diese Versuche wurden humane Monozyten mit steigenden IL-10 Konzentrationen über einen Zeitraum von 2 Tagen inkubiert und im Anschluß mit LPS restimuliert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und im ELISA auf die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen untersucht.

Die Auswertung dieser Versuche zeigte ein Expressionsmuster der Chemokin- und Zytokinfreisetzung, das der differentiellen Toleranzinduktion bei einer Vorbehandlung der Zellen mit LPS entsprach. Auch hier trat eine von der Höhe der IL-10-Vorstimulation abhängige Suppression der Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 auf (Abbildung 19). Die Freisetzung der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES war ebenfalls supprimiert (Abbildung 20). Wie bereits bei der Toleranzinduktion durch LPS zeigte sich auch hier die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 unbeeinflusst (Abbildung 21). Am Mechanismus der differentiellen Genexpression durch LPS scheinen neben IL-10 noch weitere, indirekte Mediatoren beteiligt zu sein. Die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 lag bei der Restimulation der vorbehandelten Zellen immer im Bereich der nicht-vorstimulierten Kontrollen. Bei den Versuchen mit einer LPS-Vorbehandlung hatte sich im Gegenteil dazu eine von der Höhe der Vorstimulation

abhängige Freisetzung gezeigt, die zum Teil deutlich über der Induktion in den nicht vorstimulierten Zellen lag. Weiterhin fiel die prozentuale Suppression der MIP-1 α und TNF- α Freisetzung bei der Vorstimulation der Zellen mit IL-10 im Vergleich zu einer Vorbehandlung mit LPS deutlich schwächer aus.

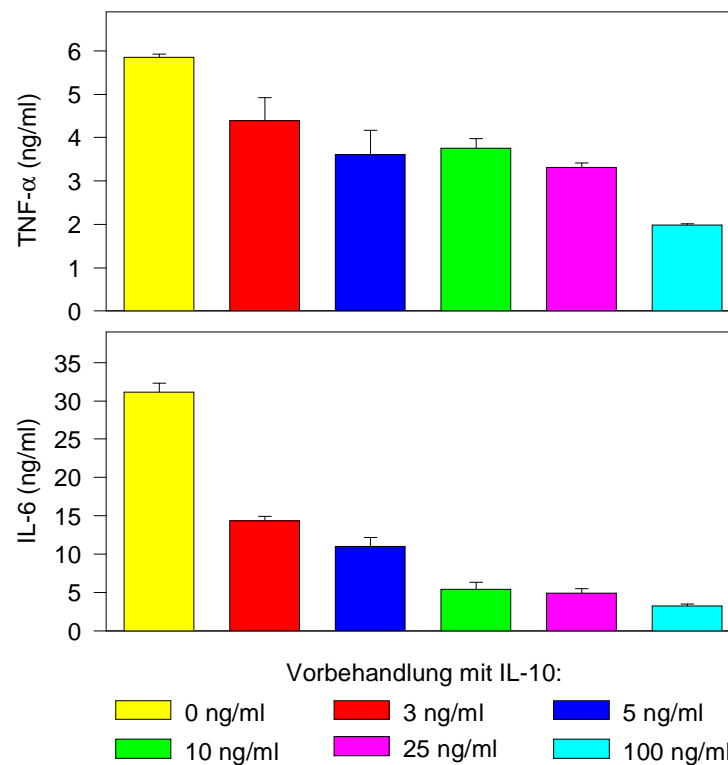


Abb.:19 Desensibilisierung der Freisetzung von Zytokinen durch IL-10.

Elutrierten Monozyten wurden mit den angegebenen IL-10-Konzentrationen über einen Zeitraum von 2 Tagen behandelt. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Überstände gewechselt und die Zellen anschließend mit LPS (10 ng/ml) restimuliert. Als Kontrolle für eine durch den ersten IL-10-Stimulus induzierte Freisetzung wurden nicht restimierte Zellkulturen mitgeführt (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Überstände geerntet und im ELISA auf die spezifische Freisetzung von TNF- α und IL-6 untersucht. Die Ergebnisse sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

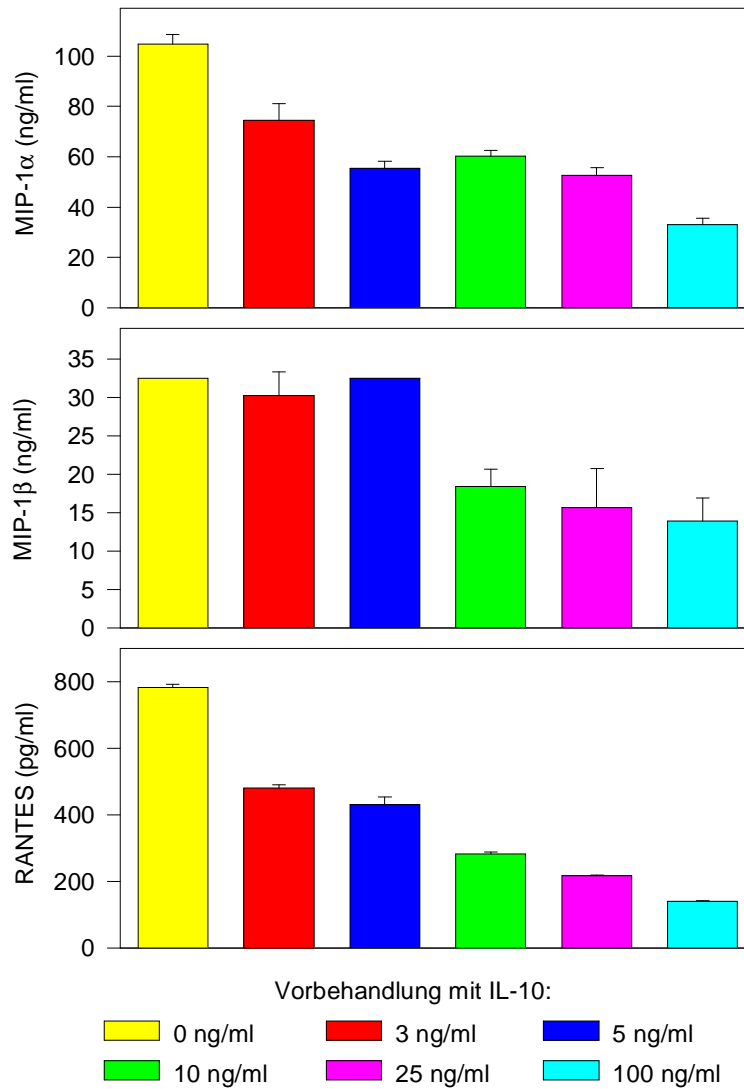


Abb.:20 Desensibilisierung der Freisetzung von Chemokinen durch IL-10. Humane Monozyten wurden nach Elutriation unter in vitro Bedingungen kultiviert und anschließend mit den angegebenen IL-10-Konzentrationen stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurden die Überstände entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Im Anschluß erfolgte die Restimulation der Zellen mit 10 ng/ml LPS. Um Effekte der ersten IL-10-Stimulation abgrenzen zu können, wurden parallel nicht-restimierte Zellkulturen mitgeführt (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und die Menge der induzierten Chemokine MIP-1α, MIP-1β und RANTES im ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als MW ± SD eines repräsentativen Spenders dargestellt.

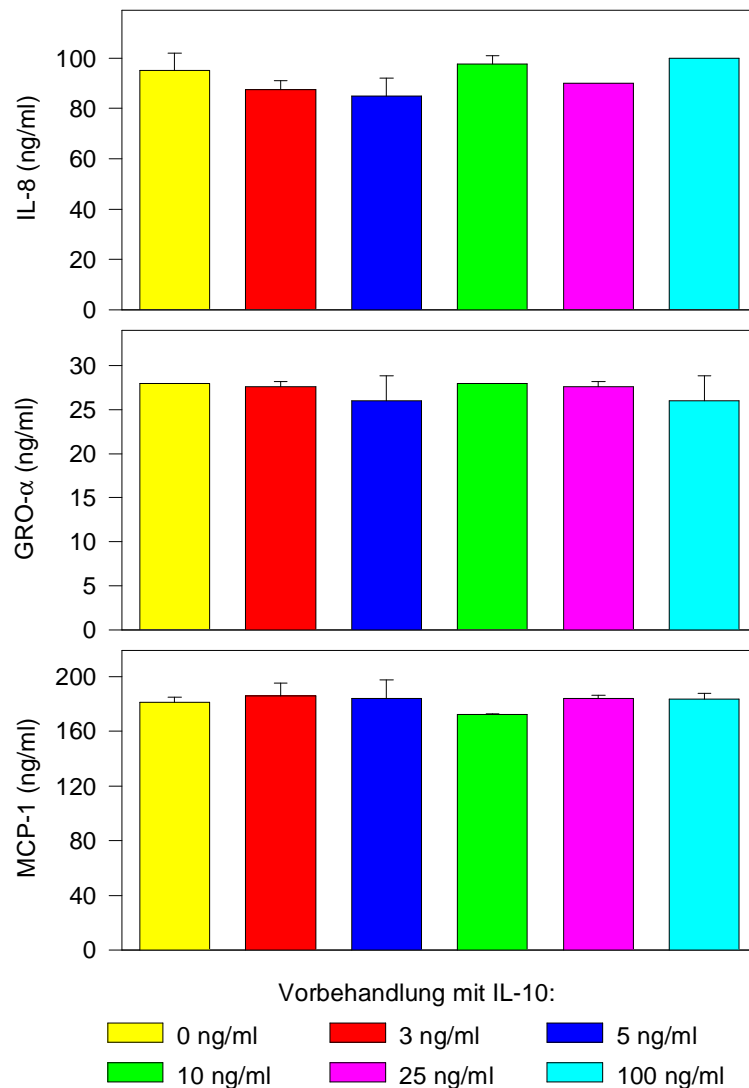


Abb.:21 Fehlende Desensibilisierung der Freisetzung von Chemokinen durch IL-10. Isolierte Monozyten wurden über einen Zeitraum von 2 Tagen mit den angegebenen Konzentrationen an IL-10 vorstimuliert. Anschließend wurden die Überstände durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit 10 ng/ml LPS restimuliert. Zur Kontrolle der durch den ersten Stimulus induzierten Freisetzung wurden Zellkulturen ohne Restimulation mitgeführt (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und auf die Freisetzung von IL-8, GRO-α und MCP-1 im ELISA untersucht. Die Ergebnisse sind die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

Im einzelnen lassen sich die Ergebnisse der Toleranzinduktion in humanen Monozyten durch LPS oder IL-10 wie folgt beschreiben: Die Vorbehandlung der Zellen mit LPS oder IL-10 führte zu einer differentiellen Desensibilisierung der Genexpression von Chemokinen und Zytokinen. Es zeigte sich, daß neben der Freisetzung der Zytokine TNF-α, IL-6 und IL-10 auch die Freisetzung der

war die induzierbare Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 bei der Restimulation der Zellen unbeeinflusst. Diese Ergebnisse konnten sowohl auf Proteinebene, RNA Ebene und auch im funktionellen Chemotaxisassay bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Induktion der differentiellen Desensibilisierung auf einem LPS-spezifischen Effekt beruhte.

3. Toleranzinduktion in humanen Zelllinien

Um einheitlichere Zellen zur Verfügung zu haben, werden häufig monozytäre Zelllinien eingesetzt. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob Mono Mac 6 Zellen oder THP-1 Zellen in dem beschriebenen Modell der Toleranzinduktion als Ersatz für primäre Monozyten verwendet werden können. Dazu wurde eine wiederholte Stimulation der Zelllinien mit LPS durchgeführt und eine eventuelle differentielle Desensibilisierung der Genexpression untersucht.

3.1. Toleranzinduktion in Mono Mac 6 Zellen durch LPS

3.1.1. Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA

Die Untersuchungen für die Toleranzinduktion in Mono Mac 6 Zellen wurden analog zu den bereits beschriebenen Versuchen der differentiellen Desensibilisierung humaner Monozyten durchgeführt. Für die Durchführung der Versuche wurden Mono Mac 6 Zellen über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden LPS-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer zweiten LPS-Gabe restimuliert. Die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen wurde durch ELISA bestimmt.

Überraschenderweise zeigten Mono Mac 6 Zellen keine differentielle

war die induzierbare Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 bei der Restimulation der Zellen unbeeinflusst. Diese Ergebnisse konnten sowohl auf Proteinebene, RNA Ebene und auch im funktionellen Chemotaxisassay bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Induktion der differentiellen Desensibilisierung auf einem LPS-spezifischen Effekt beruhte.

3. Toleranzinduktion in humanen Zelllinien

Um einheitlichere Zellen zur Verfügung zu haben, werden häufig monozytäre Zelllinien eingesetzt. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob Mono Mac 6 Zellen oder THP-1 Zellen in dem beschriebenen Modell der Toleranzinduktion als Ersatz für primäre Monozyten verwendet werden können. Dazu wurde eine wiederholte Stimulation der Zelllinien mit LPS durchgeführt und eine eventuelle differentielle Desensibilisierung der Genexpression untersucht.

3.1. Toleranzinduktion in Mono Mac 6 Zellen durch LPS

3.1.1. Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA

Die Untersuchungen für die Toleranzinduktion in Mono Mac 6 Zellen wurden analog zu den bereits beschriebenen Versuchen der differentiellen Desensibilisierung humaner Monozyten durchgeführt. Für die Durchführung der Versuche wurden Mono Mac 6 Zellen über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden LPS-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer zweiten LPS-Gabe restimuliert. Die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen wurde durch ELISA bestimmt.

Überraschenderweise zeigten Mono Mac 6 Zellen keine differentielle

bewirkte in diesen Zellen eine generelle Suppression der Freisetzung aller analysierten Zytokine und Chemokine. Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten bei der Toleranzinduktion in humanen Monozyten war hier also auch eine supprimierte Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 zu beobachten (Abbildung 22).

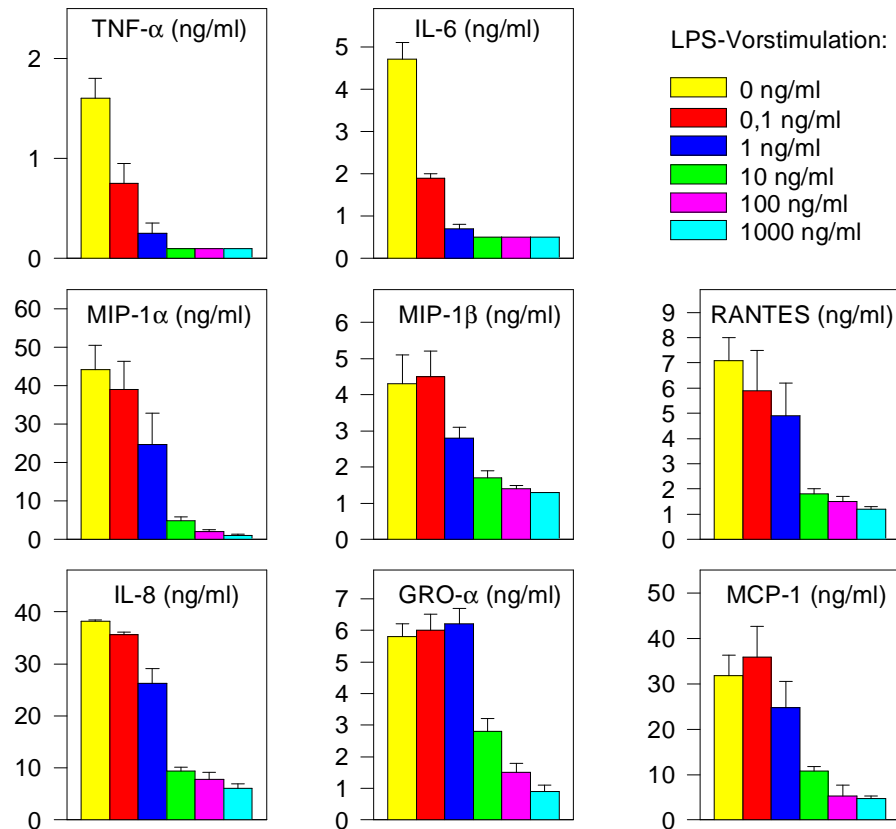


Abb.:22 Chemokin- und Zytokinproduktion durch Mono Mac 6 Zellen nach Vorstimulation mit LPS. Mono Mac 6 Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand gewechselt und durch frisches Medium ersetzt. Die Restimulation der Zellen mit 1000 ng/ml LPS erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurden die Überstände gewonnen und im ELISA auf die freigesetzten Chemokine und Zytokine untersucht. Die Ergebnisse sind als MW \pm SD eines repräsentativen Versuchs dargestellt.

3.2. Fehlende Toleranzinduktion in Mono Mac 6 Zellen durch IL-10

3.2.1. Analyse der Proteinfreisetzung durch ELISA

Für diese Versuche wurden Mono Mac 6 Zellen mit steigenden IL-10-Konzentrationen vorinkubiert und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit LPS restimuliert.

Überraschende Ergebnisse zeigten sich bei der Vorinkubation der Mono Mac 6 Zellen mit IL-10. Die anschließende Restimulation der Zellen zeigte, daß es zu keiner Suppression der untersuchten Proteinfreisetzung kam (Abbildung 23). In diesem Versuch wurde also auch nicht die Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6, sowie der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES inhibiert, die in primären Monozyten eine deutliche Desensibilisierung zeigten.

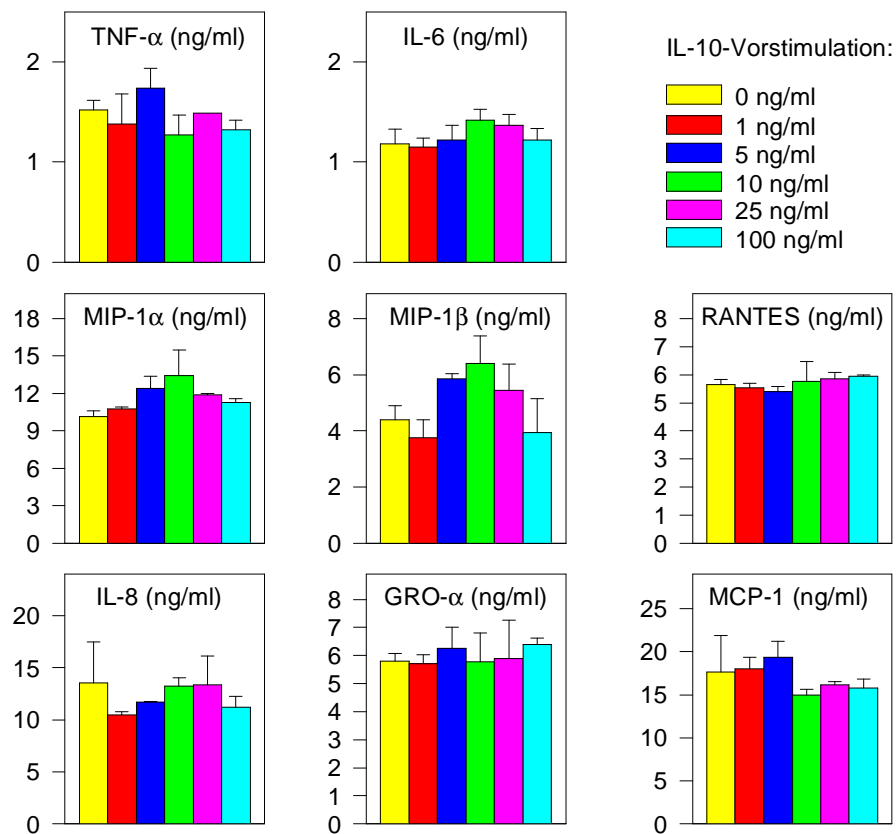


Abb.:23 Analyse der Proteinfreisetzung durch Mono Mac 6 Zellen nach Vorbehandlung mit IL-10. Die kultivierten Mono Mac 6 Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit den angegebenen IL-10-Konzentrationen (0 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml) vorinkubiert. Nach dem anschließenden Mediumwechsel wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS restimuliert und die Freisetzung der induzierten Chemokine und Zytokine im ELISA bestimmt. Als Ergebnisse dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Versuchs.

3.3. Fehlende Toleranzinduktion in THP-1 Zellen durch LPS

3.3.1. Analyse der Proteinfreisetzung im ELISA

Die Versuche wurden in analoger Weise zu den Untersuchungen mit den Mono Mac 6 Zellen durchgeführt. Die THP-1 Zellen wurden zunächst mit LPS über einen Zeitraum von 2 Tagen vorstimuliert. Anschließend wurde der Überstand gewechselt und die Zellen mit einer zweiten LPS-Gabe restimuliert. Die Menge der freigesetzten Chemokine und Zytokine wurden im ELISA bestimmt.

Die Untersuchung der Toleranzinduktion von THP-1 Zellen durch LPS ergab ein Induktionsmuster, daß sich sowohl von der differentiellen Desensibilisierung in primären Monozyten als auch von der Suppression aller untersuchten Proteine in Mono Mac 6 Zellen unterschied. Wie sich zeigte, führte die nach einer LPS-Vorbehandlung durchgeführte Restimulation der Zellen mit LPS zu keiner Suppression der Chemokinfreisetzung. Neben der unbeeinflußten Expression der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 zeigten also auch die anderen Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES im Gegensatz zu den Beobachtungen in primären Monozyten und Mono Mac 6 Zellen keine durch LPS induzierte Suppression der Freisetzung (Abbildung 24).

Auffallend war weiterhin, daß es unter diesen Versuchsbedingungen zu keiner signifikanten Freisetzung der Zytokine TNF- α , IL-6 oder IL-10 durch die THP-1 Zellen kam (nicht dargestellt).

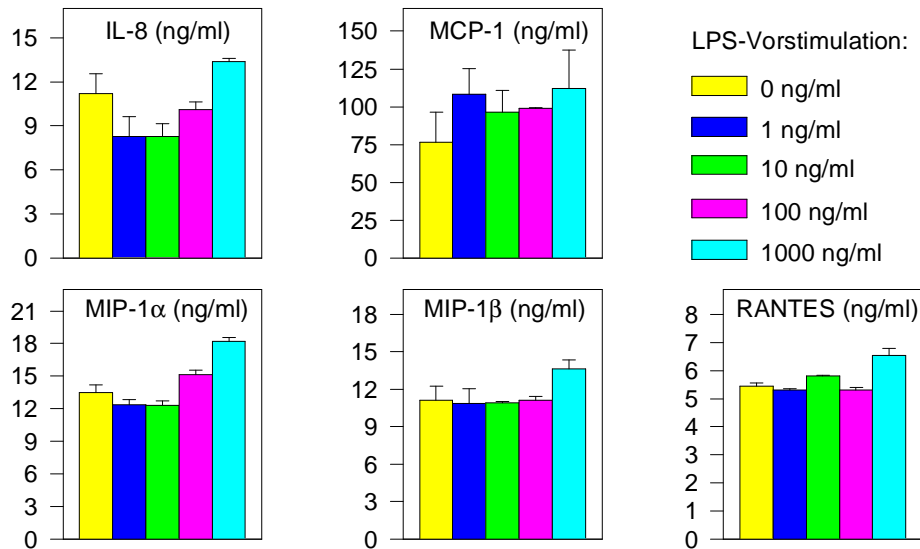


Abb.:24 Analyse der Chemokinfreisetzung durch THP-1 Zellen nach Vorstimulation durch LPS. Die THP-1 Zellen wurden mit den angegebenen LPS-Konzentrationen (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) über einen Zeitraum von 2 Tagen vorinkubiert. Anschließend wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit einer weiteren LPS-Dosis von 1000 ng/ml restimuliert. Die in den Überstand freigesetzten Chemokine wurden im ELISA bestimmt. Als Ergebnisse dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Versuchs.

3.4. Fehlende Toleranzinduktion in THP-1 Zellen durch IL-10

3.4.1. Analyse der Proteinfreisetzung im ELISA

Die THP-1 Zellen wurden für diese Versuche mit steigenden IL-10-Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden vorinkubiert und anschließend mit einer Dosis von 100 ng/ml LPS restimuliert. Die Freisetzung der induzierten Chemokine wurde im spezifischen ELISA bestimmt.

Eine weitere Besonderheit zeigten die THP-1 Zellen nach einer Vorstimulation mit IL-10 (Abbildung 25). Im Gegensatz zu den bereits beobachteten Effekten einer differentiellen Desensibilisierung in primären Monozyten und der unbeeinflussten Freisetzung in Mono Mac 6 Zellen war die Freisetzung der Chemokine IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES durch THP-1 Zellen nach der Restimulation mit LPS in Abhängigkeit von der Dosis der IL-10-Vorstimulation deutlich erhöht.

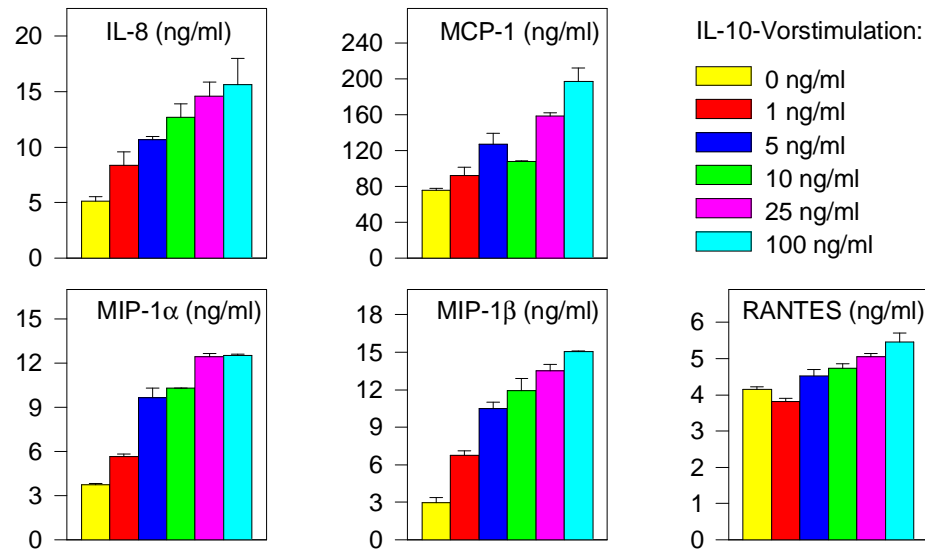


Abb.:25 Analyse der Proteinfreisetzung durch THP-1 Zellen nach Vorbehandlung mit IL-10. Kultivierte THP-1 Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit steigenden IL-10-Konzentrationen (0 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml) vorbehandelt. Anschließend wurden die Überstände durch frisches Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden mit 100 ng/ml LPS restimuliert. Die Bestimmung der induzierten Chemokine erfolgte aus diesen Überständen und wurde im ELISA durchgeführt. Als Ergebnisse dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Versuchs.

Die Ergebnisse der Versuche mit humanen Zelllinien machten deutlich, daß sich Mono Mac 6 Zellen und THP-1 Zellen nicht als Ersatz für primäre Monozyten zur Analyse der Toleranzinduktion eigneten. In keiner der beiden untersuchten Zelllinien konnte eine differentielle Desensibilisierung der Genexpression durch Vorstimulation mit LPS oder IL-10 induziert werden. Weiterhin zeigten sich bereits deutliche Unterschiede in dem Verhalten der beiden untersuchten Zelllinien bei einer Restimulation mit LPS.

So zeigte sich in LPS-vorinkubierten Mono Mac 6 Zellen eine Suppression aller untersuchten Gene nach einer zweiten LPS-Stimulation. In den THP-1 Zellen war im Gegensatz dazu die Genexpression nach einer Restimulation unbeeinflusst. Weiterhin zeigten sich auch deutliche Unterschiede in dem Verhalten der beiden Zelllinien nach einer Vorstimulation mit IL-10. Während eine Vorstimulation mit IL-10 in Mono Mac 6 Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Proteinfreisetzung nach Restimulation mit LPS führte, zeigten THP-1 Zellen eine von der Dosis der IL-10-Vorbehandlung abhängige, deutlich erhöhte Freisetzung

4. Chemokin- und Zytokininduktion durch MALP-2

Das MALP-2-Molekül ist ein Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von 2 kD, das aus *Mycoplasma fermentans* isoliert und aufgereinigt wurde. Zunächst sollte die Chemokin- und Zytokininduktion durch MALP-2 in humanen Monozyten untersucht werden. Weiterhin sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob eine Vorstimulation mit MALP-2 im Vergleich mit LPS die Restimulierbarkeit der Chemokin- und Zytokininduktion ebenfalls differentiell desensibilisierte.

4.1. Änderung der Morphologie nach MALP-2-Stimulation

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von MALP-2 mit humanen Monozyten eine Änderung des Aktivierungszustandes bewirkte, wurden die stimulierten Zellen bezüglich ihrer Morphologie im Lichtmikroskop beobachtet. In Abbildung 26 sind die unterschiedlichen Aktivierungszustände fotografisch dargestellt. Die nicht stimulierten Kontrollzellen zeigten eine schwach ausgeprägte Adhärenz. Sie bestanden überwiegend aus kreisrunden Zellen, und nur einige bildeten bereits makrophagentypische Zytoplasmaausläufer aus (Abbildung 26A). 24 Stunden nach der Stimulation mit MALP-2 war eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie zu erkennen. Die Zellen zeigten eine sehr stark ausgeprägte Adhärenz. Sie wurden deutlich unregelmäßiger und bildeten vermehrt Zytoplasmafortsätze aus (Abbildung 26B). Die Stimulation der Zellen mit MALP-2 bewirkte eine ähnliche Veränderung der Zellmorphologie wie eine Stimulation mit LPS, die zusätzlich als Positivkontrolle durchgeführt wurde (Abbildung 26C).

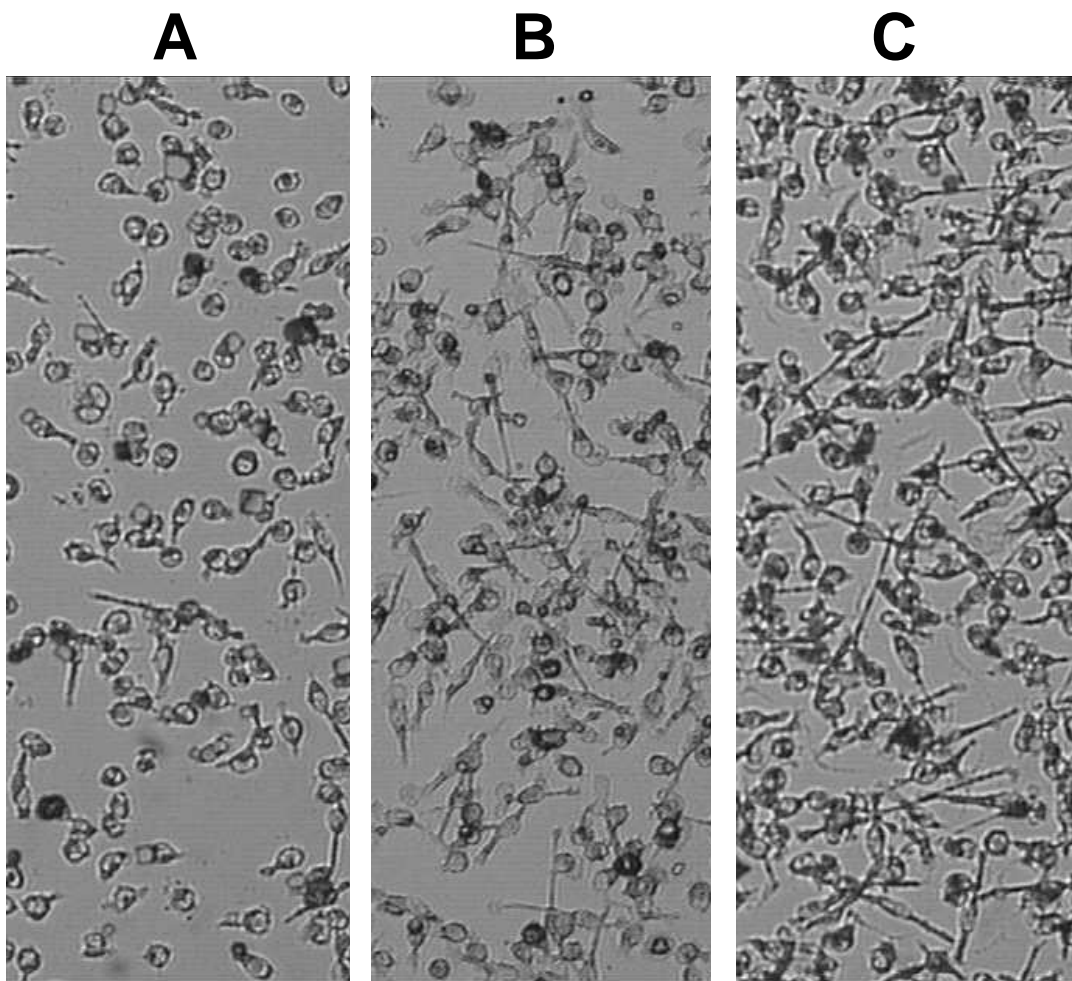


Abb.:26 Änderung der Morphologie humaner Monozyten nach Stimulation mit MALP-2 und LPS. Kultivierte Monozyten wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 35 U/ml MALP-2 (B) oder 10 ng/ml LPS (C) stimuliert. Als Negativkontrolle wurde eine nicht behandelte Zellkultur mitgeführt (A). Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und die Zellen mit einer 20%igen Methanollösung fixiert. Die Beurteilung der Veränderungen der Morphologie erfolgte im Lichtmikroskop.

4.2. Dosisabhängigkeit der Chemokin- und Zytokininduktion durch MALP-2

Um die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation der Zellen mit MALP-2 näher zu untersuchen, wurde zunächst die Dosisabhängigkeit ihrer Induktion analysiert.

Hierfür wurden über Elutriation gereinigte Monozyten unter Standardbedingungen kultiviert und mit steigenden MALP-2-Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden stimuliert. Die Menge der freigesetzten Chemokine und Zytokine wurde anschließend im ELISA bestimmt.

Es zeigte sich eine von der MALP-2-Dosis abhängige Induktion der Chemokin- und Zytokinfreisetzung (Abbildung 27). Im einzelnen war eine Induktion der Chemokinfreisetzung bereits durch geringe MALP-2-Konzentrationen zu beobachten. Bereits Konzentrationen von 3,5 U/ml waren für eine signifikante Freisetzung ausreichend waren. Im Gegensatz dazu wurden für die Induktion der Zytokinfreisetzung 10-100-fach höhere Mengen MALP-2 benötigt. Signifikante Unterschiede zeigten sich erst bei einer Stimulation mit 35 U/ml. Weiterhin auffallend war die fast vollständig fehlende Induktion von IL-10. Erst durch sehr hohe Konzentrationen (350 U/ml) wurde IL-10 geringfügig induziert. Ähnlich wie nach LPS wurde das Chemokin RANTES in undifferenzierten Monozyten nach einer Stimulation mit MALP-2 nicht freigesetzt.

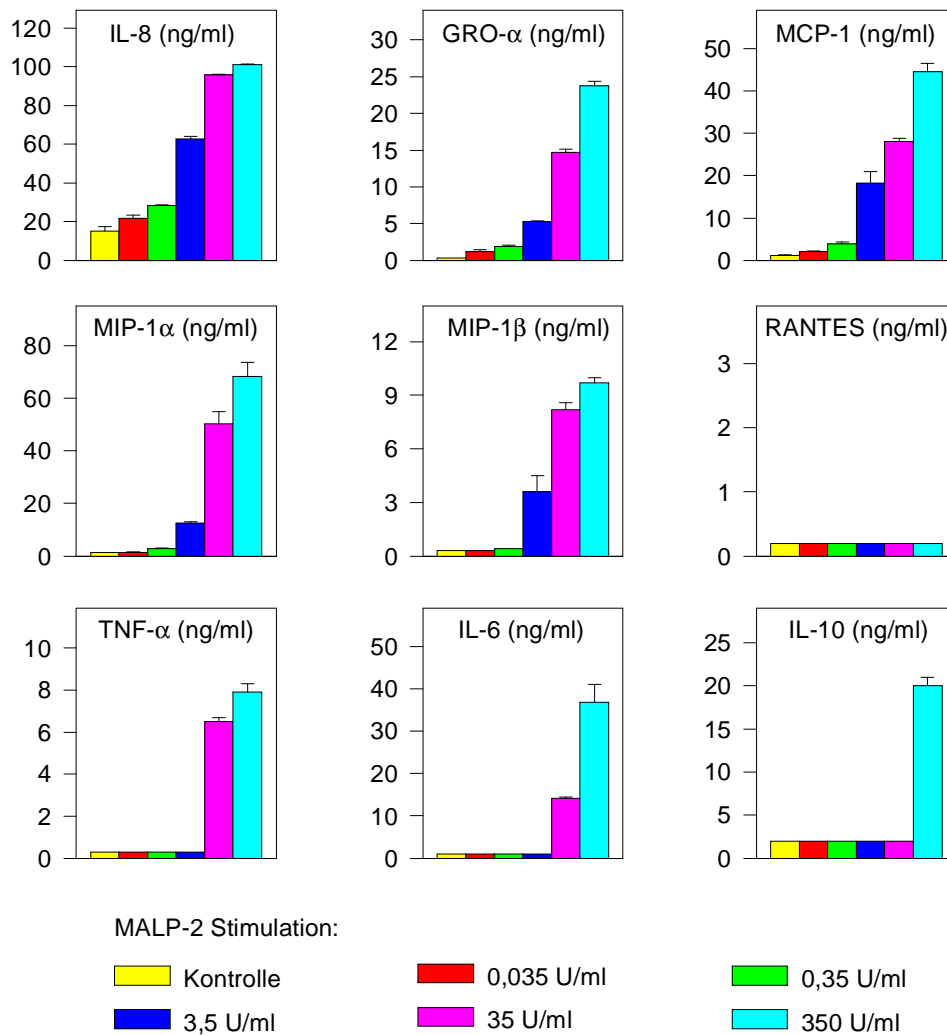


Abb.:27 Dosisabhängigkeit der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen aus humanen Monozyten nach Stimulation mit MALP-2.
 Die elutrierten Monozyten wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit steigenden MALP-2-Konzentrationen (0 U/ml (Kontrolle), 0,035 U/ml, 0,35 U/ml, 3,5 U/ml, 35 U/ml und 350 U/ml) stimuliert. Im Anschluß wurde der Überstand gewonnen und die freigesetzten Chemokine und Zytokine in spezifischen ELISA's bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

4.3. Kinetik der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation mit MALP-2

Um die Induzierbarkeit von Chemokinen und Zytokinen in humanen Monozyten durch MALP-2 weiter zu charakterisieren, wurde der zeitliche Verlauf ihrer Freisetzung analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit MALP-2 stimuliert und der Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Die Analyse der freigesetzten Proteinmengen erfolgte anschließend mit Hilfe spezifischer ELISA's. Reproduzierbar zeigte sich eine starke Induktion von Chemokinen und Zytokinen nach einer Stimulation mit MALP-2. Die Auswertung des zeitlichen Verlaufs machte deutlich, daß es innerhalb der ersten 24 Stunden nach Stimulation zu einem starken Anstieg der Freisetzung kam. Auffallend war die rasche Induktion der Chemokinfreisetzung, die bereits 4-8 Stunden nach Stimulation signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle erkennen ließ. Nach ca. 24 Stunden war das Maximum der Freisetzung erreicht. Parallel zur Chemokininduktion verlief die Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6. Eine Induktion der IL-10-Freisetzung konnte, wie bereits bei der Analyse der dosisabhängigen Induzierbarkeit, nicht nachgewiesen werden. Weiterhin kam es zu keiner signifikanten Freisetzung von RANTES, da diese Versuche mit undifferenzierten Monozyten durchgeführt wurden. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich eine Stimulation der Zellen mit LPS über den gesamten zeitlichen Verlauf durchgeführt. Der Vergleich zeigte, daß durch die höchsten MALP-2-Konzentrationen ähnlich hohe Mengen an Chemokinen und Zytokinen induziert werden konnten, wie durch eine Stimulation der Monozyten mit LPS. In der Abbildung 28 sind exemplarisch die zeitlichen Verläufe für die Freisetzung von IL-8, MIP-1 α und TNF- α dargestellt. Die Kinetiken der anderen untersuchten Chemokine (GRO- α , MIP-1 β , MCP-1 und RANTES) und des Zytokins IL-6 zeigten einen ähnlichen zeitlichen Verlauf.

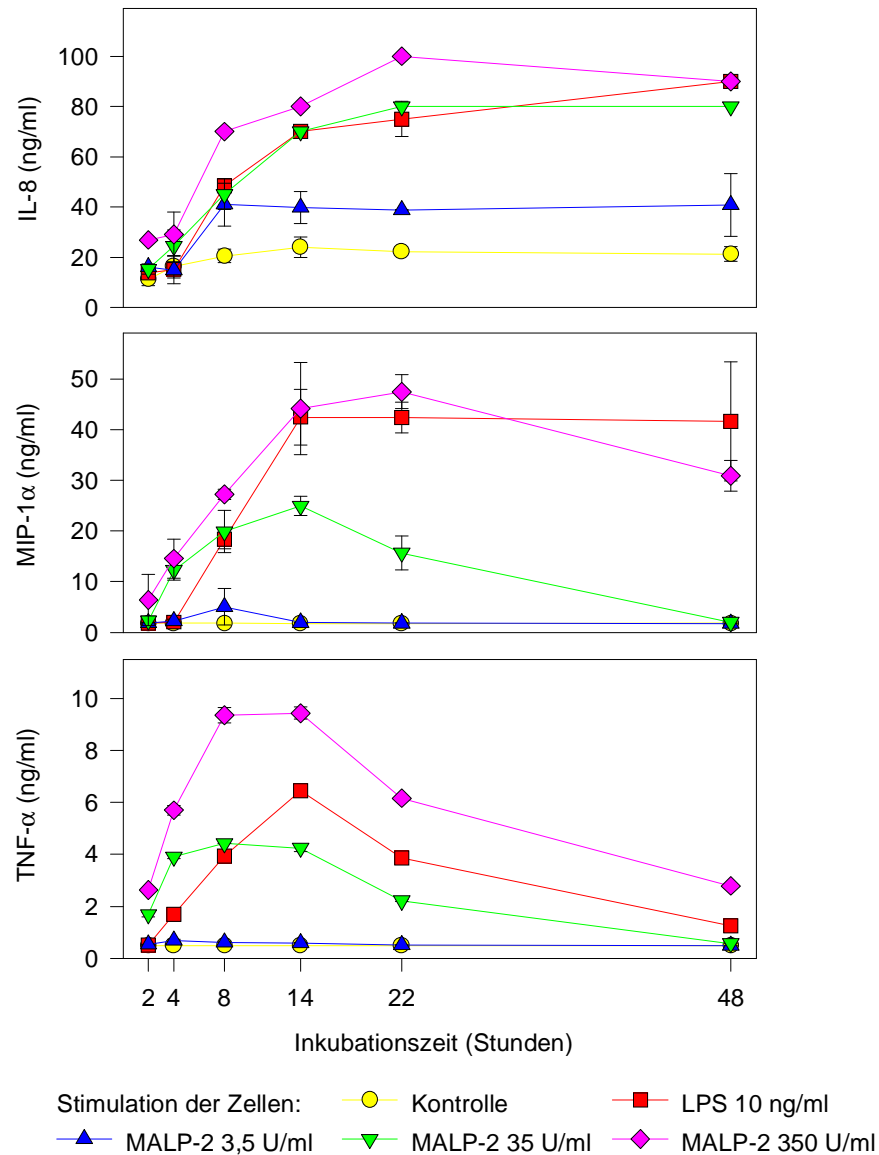


Abb.:28 Kinetik der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen aus humanen Monozyten nach Stimulation mit MALP-2.

Humane Monozyten wurden nach Elutriation unter in vitro Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend über die angegebenen Zeiträume (2, 4, 8, 14, 22 und 48 Stunden) mit verschiedenen MALP-2-Konzentrationen (3,5 U/ml, 35 U/ml und 350 U/ml) stimuliert. Nicht-behandelte Monozytenkulturen dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurden Monozytenkulturen mit 10 ng/ml LPS aktiviert. Nach den Inkubationszeiten wurden die Überstände geerntet und im ELISA auf die freigesetzten Chemokine IL-8 und MIP-1α und das Zytokin TNF-α untersucht. Dargestellt sind die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

4.4. Analyse der Chemokin- und Zytokin-mRNA-Expression nach Stimulation der Zellen mit MALP-2

Die gesteigerte Produktion von Chemokinen und Zytokinen durch Monozyten nach Stimulation mit MALP-2 wurde auch durch die Analysen der mRNA-Expression bestätigt. Auch hier zeigte sich eine deutliche Induktion der untersuchten Gene, die von der Höhe der MALP-2-Stimulation abhängig war.

Für die Northern Blot-Analysen wurden über Elutriation gereinigte Monozyten für einen Zeitraum von 8 Stunden mit steigenden MALP-2-Konzentrationen inkubiert. Um unspezifisch induzierende Effekte abgrenzen zu können, wurde zusätzlich eine nicht-stimulierte Zellkultur als Negativkontrolle mitgeführt. Weiterhin diente eine LPS-stimulierte Kultur als Positivkontrolle. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert, die RNA präpariert und anschließend die spezifische mRNA-Expression mit Hilfe DIG-markierter Riboprobes analysiert.

Die Induktion der mRNA-Expression durch MALP-2 konnte für die Chemokine IL-8, MCP-1 und MIP-1 α sowie für das Zytokin TNF- α nachgewiesen werden (Abbildung 29). Deutlich zu beobachten war die Abhängigkeit der mRNA-Induktion von der Höhe der MALP-2-Stimulation. Bereits 3,5 U/ml reichten für eine signifikante Expression aus. Die maximale Genexpression, wie nach LPS-Stimulation, konnte durch die höchste MALP-2-Konzentration (175 U/ml) jedoch nicht erreicht werden. Die nur sehr schwach ausgeprägte Induktion der RANTES-mRNA bestätigte die Ergebnisse der Proteindaten, da auch in diesem Versuch undifferenzierte Monozyten für die Stimulation eingesetzt wurden. Bei Spender 1 induzierte sowohl MALP-2 als auch LPS das MCP-1 Gen nur schwach, unabhängig von der Höhe der Dosis. Diese Besonderheit konnte mehrmals beobachtet werden. Es fanden sich wiederholt Spender, die auf eine Stimulation nicht mit einer Freisetzung oder mRNA-Expression von MCP-1 reagierten. Die Freisetzung der anderen untersuchten Chemokine und Zytokine war bei diesen Spendern im Gegensatz dazu nicht verändert.

4.5. Toleranzinduktion durch MALP-2

Die Analyse der Restimulierbarkeit humaner Monozyten mit MALP-2 zeigte, daß es im Gegensatz zur LPS-Toleranzinduktion zu einem anderen Desensibilisierungsmuster kam. Die Vorbehandlung der Zellen mit niedrigen MALP-2-Konzentrationen bewirkte eine Suppression der Freisetzung **aller** analysierten Chemokine und Zytokine.

4.5.1. Analyse der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch ELISA

Die Versuche zur Toleranzinduktion durch MALP-2 wurden analog zu den bereits beschriebenen Versuchen der differentiellen Desensibilisierung humaner Monozyten mit LPS durchgeführt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden MALP-2-Konzentrationen inkubiert und anschließend nochmals mit MALP-2 (35 U/ml) restimuliert. Die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen wurde durch ELISA bestimmt.

Auf Proteinebene zeigte sich, daß die Vorstimulation primärer, humaner Monozyten mit MALP-2 keine differentielle Desensibilisierung induzierte. Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 und aller untersuchten Chemokine wurde supprimiert. Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten bei der Toleranzinduktion mit LPS trat bei der Restimulation mit MALP-2 also auch eine Suppression der Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 auf (Abbildung 30).

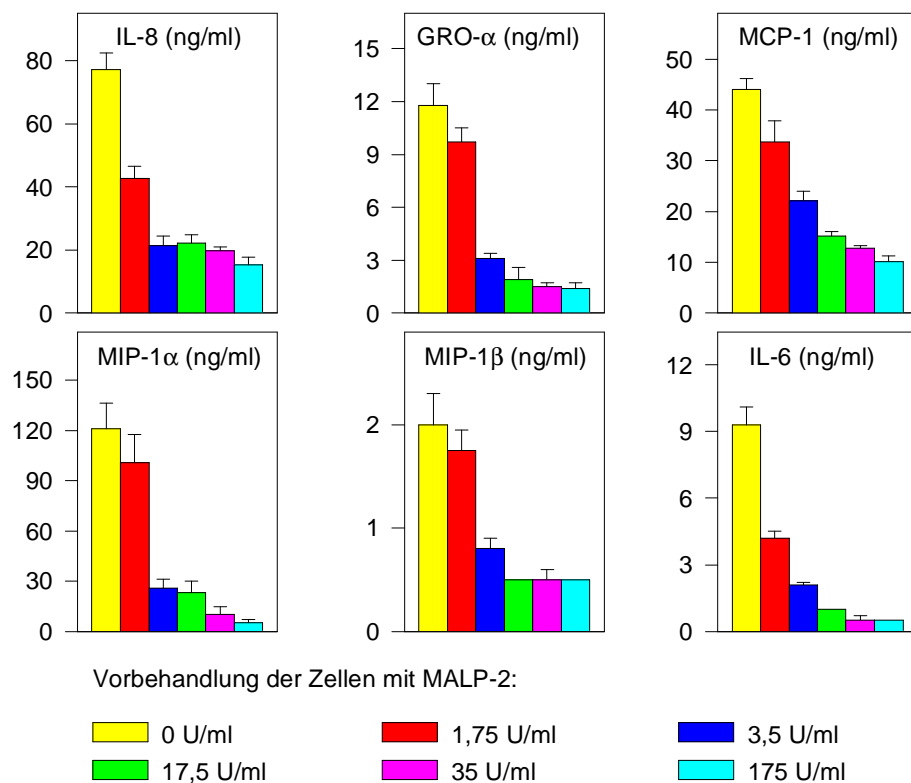


Abb.:30 Analyse der Chemokin- und Zytokinfreisetzung durch Monozyten nach Toleranzinduktion mit MALP-2.

Primäre, humane Monozyten wurden unter Standardbedingungen kultiviert und über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden MALP-2-Konzentrationen (0 U/ml, 1,75 U/ml, 3,5 U/ml, 17,5 U/ml, 35 U/ml und 175 U/ml) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand gewechselt und durch frisches Medium ersetzt. Die Restimulation der Zellen mit 35 U/ml erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurden die Überstände gewonnen und im ELISA auf die freigesetzten Chemokine und Zytokine analysiert. Die Ergebnisse sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

4.5.2. Analyse der Chemokin mRNA-Expression nach Toleranzinduktion durch MALP-2

Für diese Northern Blot-Analysen wurden humane Monozyten mit verschiedenen MALP-2-Konzentrationen vorstimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen wurde der Überstand gewechselt und die Zellen anschließend mit einer zweiten MALP-2-Gabe (35 U/ml) restimuliert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 8 Stunden wurden die Zellen lysiert und die RNA präpariert. Im Anschluß erfolgte die Untersuchung der induzierten Genexpression mit Hilfe DIG-markierter Ribonukleotids

Die zuvor auf Proteinebene gezeigte Suppression der Chemokinfreisetzung nach Restimulation humaner Monozyten mit MALP-2 konnte durch die Analyse der mRNA-Expression bestätigt werden. Auch hier bewirkte die Vorbehandlung der Zellen eine Desensibilisierung, die bei einer nachfolgenden Stimulation zur Reduktion der induzierbaren mRNA-Menge führte. Die induzierbare Toleranz korrelierte mit der Höhe der MALP-2-Vorstimulation. Repräsentativ wurde die Expression der IL-8- und MIP-1 α -mRNA gezeigt (Abbildung 31).

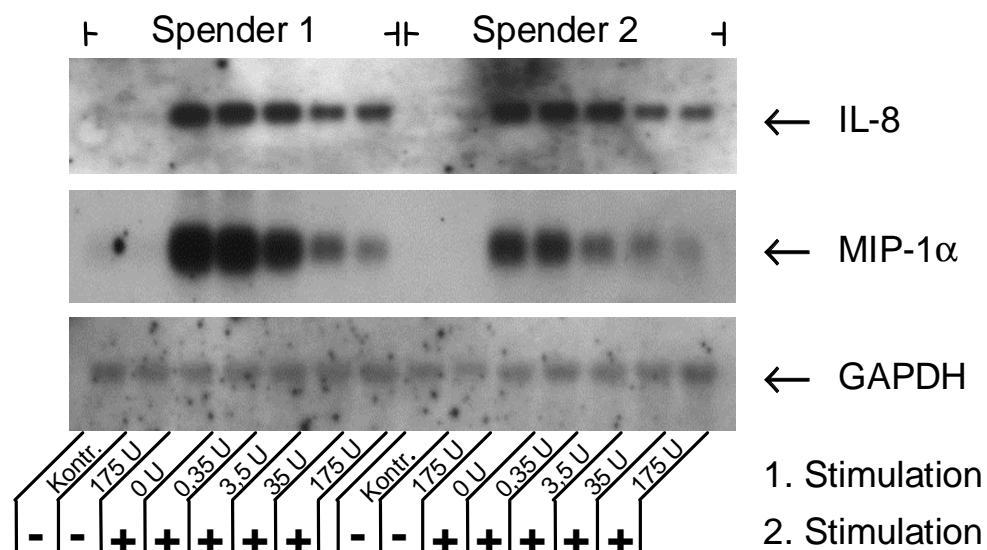


Abb.:31 Genexpression in humanen Monozyten nach Toleranzinduktion durch MALP-2. Humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden MALP-2-Konzentrationen (0 U/ml, 0,35 U/ml, 3,5 U/ml, 35 U/ml und 175 U/ml) vorbehandelt. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand gewechselt und die Zellen anschließend mit einer Dosis von 35 U/ml MALP-2 restimuliert. Als Kontrolle für eine durch den ersten Stimulus induzierte mRNA-Expression wurde eine nicht-restimulierte Zellkultur mitgeführt. Diese Kultur war zuvor mit der höchsten MALP-2-Dosis (175 U/ml) stimuliert worden. Um unspezifische Einflüsse abgrenzen zu können, wurde weiterhin eine nicht-stimulierte Zellkultur als Negativkontrolle mitgeführt. Nach der zweiten Inkubationszeit von 8 Stunden wurde der Überstand verworfen, die Zellen lysiert und die RNA präpariert. Anschließend wurde die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Expression von IL-8 und MIP-1 α mit Hilfe spezifischer, DIG-markierter Riboprobes analysiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Menge aufgetragener RNA diente das konstitutiv exprimierte Gen für das Enzym GAPDH. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 repräsentativen Spendern.

4.5.3. Einfluß von PMA und Zymosan auf die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen in MALP-2 toleranten Monozyten

Durch die Restimulation Toleranz-induzierter Zellen mit PMA oder Zymosan konnte gezeigt werden, daß der beobachtete Effekt der Desensibilisierung nicht durch eine refraktäre Phase der Zellen bedingt war. Die Restimulation der Zellen mit PMA oder Zymosan ergab eine unbeeinflusste Freisetzung aller untersuchten Chemokine und Zytokine, unabhängig von einer Vorstimulation mit LPS oder MALP-2. Die freigesetzten Mengen lagen immer im Bereich der nicht-vorstimulierten Kontrollzellen (Abbildung 32).

Dazu wurden humane Monozyten mit steigenden MALP-2-Konzentrationen über einen Zeitraum von 2 Tagen vorstimuliert und anschließend mit PMA oder Zymosan restimuliert. Als Kontrolle wurde gleichzeitig eine Restimulation mit MALP-2 durchgeführt (nicht dargestellt). In der Abbildung 32 ist exemplarisch die Freisetzung von MCP-1, MIP-1 α und TNF- α dargestellt.

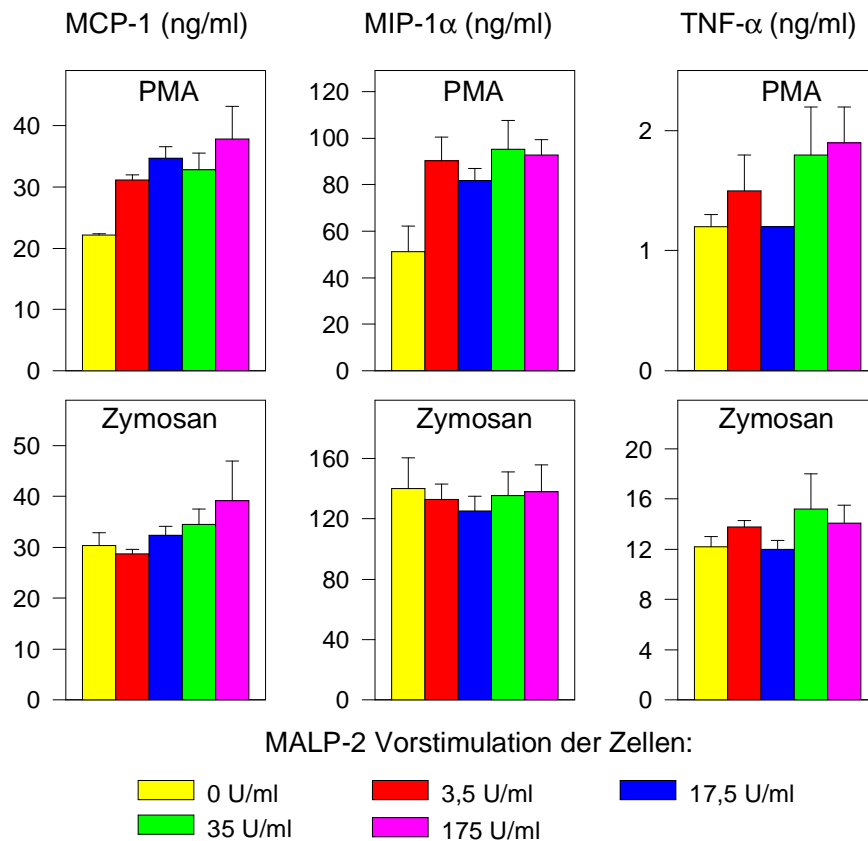


Abb.:32 Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Restimulation MALP-2 toleranter Zellen mit PMA oder Zymosan.

Über Elutriation aufgereinigte Monozyten wurden über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden MALP-2-Konzentrationen (0 U/ml, 3,5 U/ml, 17,5 U/ml, 35 U/ml und 175 U/ml) vorinkubiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Die Restimulation der Zellen erfolgte mit PMA (10 ng/ml) oder Zymosan (15 Partikel/Monozyt) über 24 Stunden. Die geernteten Überstände wurden im ELISA auf die Freisetzung der Chemokine und Zytokine untersucht. Die Werte sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

Im einzelnen lassen sich die Ergebnisse der Stimulationsversuche humaner Monozyten mit MALP-2 wie folgt beschreiben: Die Interaktion der Zellen mit MALP-2 induzierte eine starke Chemokin- und Zytokinexpression. Als morphologisches Korrelat dieser Aktivierung ließen sich deutliche Veränderungen der Zellstruktur erkennen. Neben der Induktion der klassischen proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-6 konnte die Freisetzung von verschiedenen Chemokinen beobachtet werden. Es zeigte sich eine Induktion der Freisetzung von IL-8, GRO-α, MCP-1, MIP-1α und MIP-1β. Auffallend war

wirkenden Zytokins IL-10. Seine Freisetzung konnte nur durch sehr hohe Dosen geringfügig induziert werden.

Die Vorbehandlung humaner Monozyten mit MALP-2 führte zu einer generellen Desensibilisierung der Genexpression. Es zeigte sich, daß neben der Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 auch die Freisetzung aller untersuchter Chemokine (IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β) supprimiert wurde. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Befunden der LPS-Toleranzinduktion. Wie bereits beschrieben, zeigte sich hier eine differentielle Desensibilisierung mit einer unbeeinflussten Freisetzung einiger Chemokine.

5. Chemokin- und Zytokininduktion durch OspA

Das OspA-Molekül ist ein Lipoprotein aus der Zellmembran von *Borrelia burgdorferi*. Zunächst sollten die Chemokin- und Zytokin-induzierenden Eigenschaften nach Stimulation humaner Monozyten mit OspA näher charakterisiert werden, sowie dessen Einfluß auf die Restimulierbarkeit der Zellen. Von besonderer Bedeutung war hierbei die Fragestellung, ob die Restimulation der Zellen mit OspA eine differentielle Desensibilisierung der Chemokinfreisetzung bewirkte, wie für den Fall einer LPS-induzierten Toleranz gezeigt werden konnte, oder ob eine vollständige Suppression der Chemokinfreisetzung eintrat, wie nach MALP-2-Toleranzinduktion

5.1. Änderung der Morphologie nach OspA Stimulation

Die Stimulation humaner Monozyten mit OspA induzierte eine morphologische Veränderung der Zellen, die in der Abbildung 33 dargestellt ist. Die nicht-stimulierten Kontrollzellen waren nur schwach adhärent und zeigten häufig eine

wirkenden Zytokins IL-10. Seine Freisetzung konnte nur durch sehr hohe Dosen geringfügig induziert werden.

Die Vorbehandlung humaner Monozyten mit MALP-2 führte zu einer generellen Desensibilisierung der Genexpression. Es zeigte sich, daß neben der Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 auch die Freisetzung aller untersuchter Chemokine (IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β) supprimiert wurde. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Befunden der LPS-Toleranzinduktion. Wie bereits beschrieben, zeigte sich hier eine differentielle Desensibilisierung mit einer unbeeinflussten Freisetzung einiger Chemokine.

5. Chemokin- und Zytokininduktion durch OspA

Das OspA-Molekül ist ein Lipoprotein aus der Zellmembran von *Borrelia burgdorferi*. Zunächst sollten die Chemokin- und Zytokin-induzierenden Eigenschaften nach Stimulation humaner Monozyten mit OspA näher charakterisiert werden, sowie dessen Einfluß auf die Restimulierbarkeit der Zellen. Von besonderer Bedeutung war hierbei die Fragestellung, ob die Restimulation der Zellen mit OspA eine differentielle Desensibilisierung der Chemokinfreisetzung bewirkte, wie für den Fall einer LPS-induzierten Toleranz gezeigt werden konnte, oder ob eine vollständige Suppression der Chemokinfreisetzung eintrat, wie nach MALP-2-Toleranzinduktion

5.1. Änderung der Morphologie nach OspA Stimulation

Die Stimulation humaner Monozyten mit OspA induzierte eine morphologische Veränderung der Zellen, die in der Abbildung 33 dargestellt ist. Die nicht-stimulierten Kontrollzellen waren nur schwach adhärent und zeigten häufig eine

Zytoplasmasausläufern war nur gelegentlich zu beobachten (Abbildung 33A). Im Gegensatz dazu zeigten die OspA-stimulierten Zellen eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie. Zu erkennen war eine stark ausgeprägte Adhärenz sowie die vermehrte Ausbildung von Zytoplasmafortsätzen (Abbildung 33B). Ähnliche Veränderungen des morphologischen Erscheinungsbildes der Monozyten ergaben sich bei einer Stimulation der Zellen mit LPS (in Abbildung 26C dargestellt).

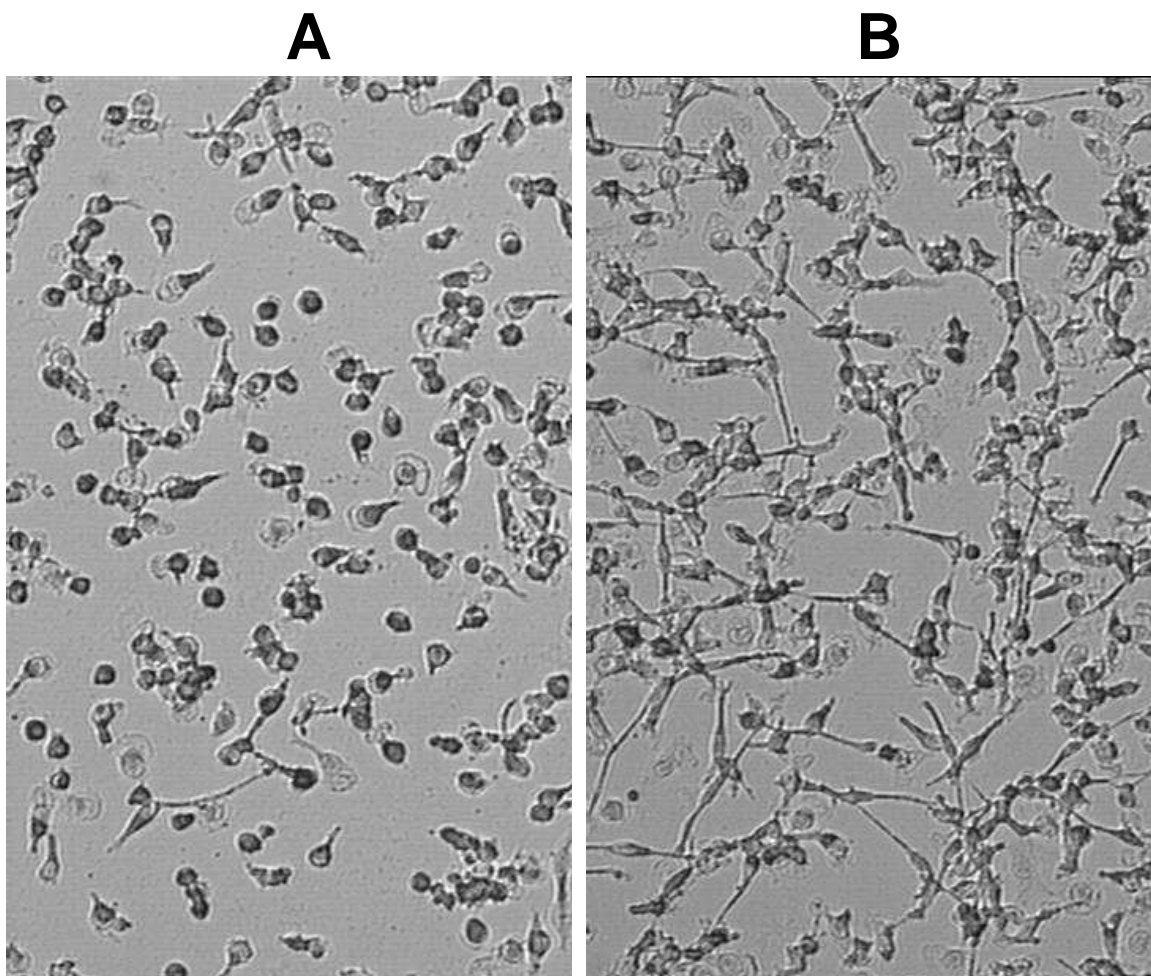


Abb.:33 Änderung der Morphologie humaner Monozyten nach Stimulation mit OspA und LPS. Die über Elutriation isolierten Monozyten wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 1000 ng/ml OspA stimuliert. Als Negativkontrolle dienten nicht-stimulierte Zellkulturen. Im Anschluß an die Inkubationszeit wurden die Überstände verworfen und die Zellen mit einer 20%igen Methanollösung für 2 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Beurteilung der morphologischen Veränderungen erfolgte im Lichtmikroskop.

5.2. Dosisabhängigkeit der Chemokin- und Zytokininduktion durch OspA

Für die weitere Charakterisierung der nach Stimulation humaner Monozyten mit OspA freigesetzten Chemokine und Zytokine wurde zunächst die Dosisabhängigkeit der Induktion analysiert.

Für diese Versuche wurden isolierte Monozyten mit steigenden OspA-Konzentrationen inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen, und die Menge der freigesetzten Chemokine und Zytokine mit Hilfe spezifischer ELISA's für IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sowie für TNF- α , IL-6 und IL-10 bestimmt.

Die Bestimmung der durch OspA induzierten Proteine zeigte eine von der Höhe der Stimulation abhängige Freisetzung. 10 - 100 ng/ml OspA war in vielen Fällen ausreichend für eine signifikante Freisetzung der Chemokine. Für die Induktion der Zytokinfreisetzung wurden im Gegensatz dazu größere Mengen OspA benötigt. Signifikante Unterschiede zur nicht-stimulierten Kontrolle zeigten sich hier erst nach einer Stimulation mit 100 - 1000 ng/ml OspA (Abbildung 34). Im Gegensatz zu den Versuchen mit MALP-2 war bei der Stimulation der Zellen mit OspA eine relativ hohe Freisetzung von IL-10 zu beobachten. Aber auch nach einer Stimulation mit OspA konnte keine Induktion des Chemokins RANTES nachgewiesen werden.

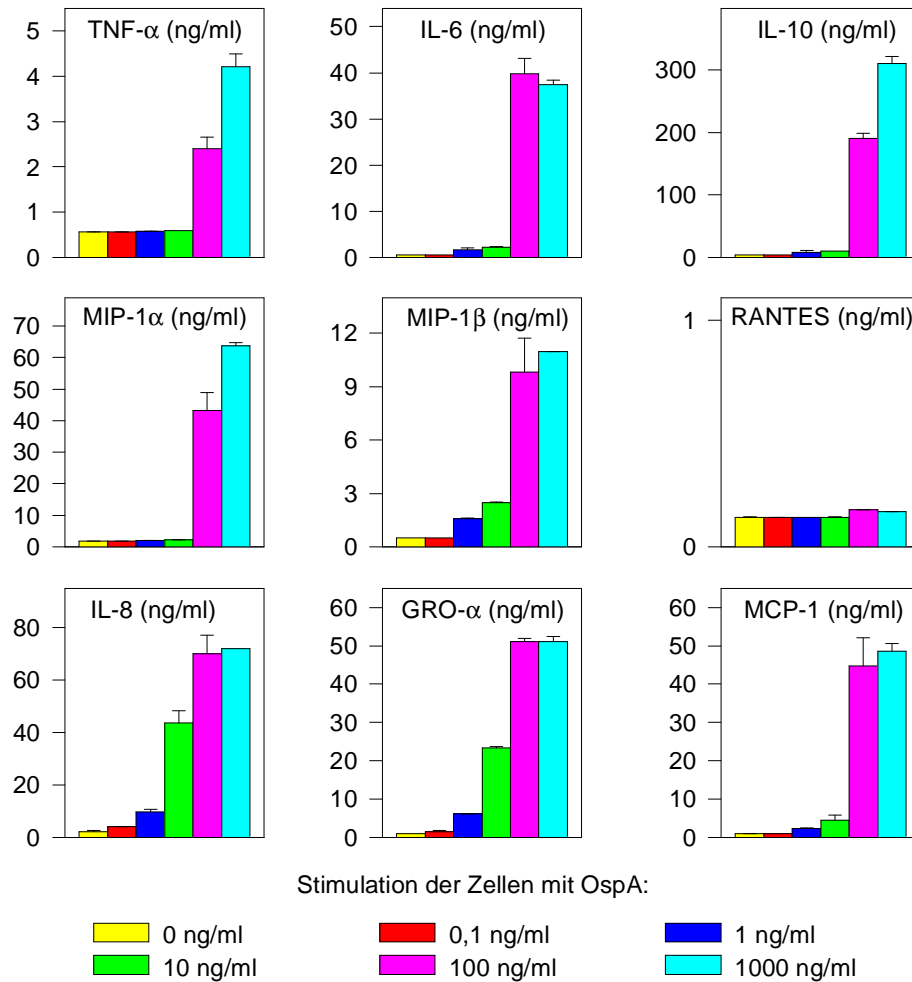


Abb.:34 Dosisabhängigkeit der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen aus humanen Monozyten nach Stimulation mit OspA.
 Kultivierte humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit verschiedenen OspA-Konzentrationen (0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) inkubiert. Der Überstand wurde geerntet und die Freisetzung der induzierten Chemokine und Zytokine in spezifischen ELISA's bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

5.3. Kinetik der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation mit OspA

Im Anschluß an diese Versuche erfolgte die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Chemokin- und Zytokinfreisetzung. Hierfür wurden humane Monozyten mit OspA stimuliert und der Überstand nach verschiedenen Zeiten geerntet. Die Analyse der induzierten Proteine erfolgte anschließend mit Hilfe spezifischer ELISA's.

Die Auswertung der Versuche zeigte eine Induktion der Chemokin- und Zytokinfreisetzung, die bereits nach 16-24 Stunden ein Maximum erreichte. Charakteristisch war eine rasche Induktion der Freisetzung. Bereits 4-8 Stunden nach der Stimulation konnten signifikant erhöhte Spiegel im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen nachgewiesen werden (Abbildung 35). Im direkten Vergleich mit einer parallel durchgeführten LPS-Stimulation zeigte sich, daß mit den höchsten OspA-Dosen eine ähnlich hohe Freisetzung der Chemokine und der Zytokine induziert werden konnte.

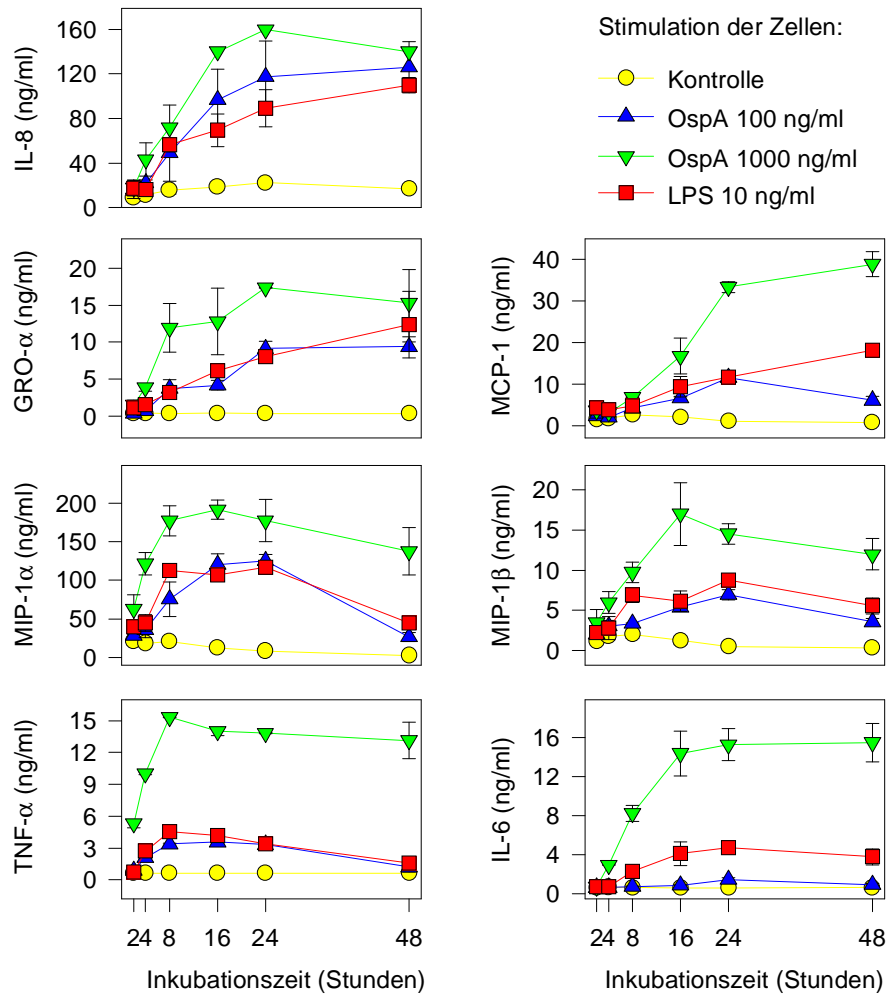


Abb.:35 Kinetik der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen aus humanen Monozyten nach Stimulation mit OspA.

Humane Monozyten wurden unter in vitro Bedingungen über die angegebenen Zeiträume (2, 4, 8, 16, 24 und 48 Stunden) mit verschiedenen OspA-Konzentrationen (100 ng/ml und 1000 ng/ml) inkubiert. Eine nicht stimulierte Zellkultur wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die parallel mit 10 ng/ml LPS aktiviert wurden. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Überstände abgenommen und anschließend im ELISA auf die freigesetzten Chemokine und Zytokine untersucht. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

5.4. Toleranzinduktion durch OspA

Die Restimulation humaner Monozyten mit OspA führte, wie bereits in den Versuchen der MALP-2 Toleranzinduktion auffiel, zu einer allgemeinen Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung. Neben der erwarteten Reduktion der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 und der Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β , zeigte sich auch hier eine Suppression der Freisetzung von IL-8, GRO- α und MCP-1. Diese Suppression konnte durch die funktionelle Analyse der chemotaktischen Aktivitäten in den toleranzinduzierten Überständen im Chemotaxisassay bestätigt werden.

5.4.1. Analyse der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch ELISA

Für die Untersuchung der Toleranzinduktion durch OspA wurden primäre, humane Monozyten verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden mit verschiedenen OspA-Konzentrationen inkubiert und anschließend mit einer zweiten OspA-Gabe für 24 Stunden restimuliert. Die Bestimmung der induzierten Chemokine und Zytokine erfolgte im Anschluß mit Hilfe spezifischer ELISA's.

Bereits auf Proteinebene zeigte sich, daß die Restimulation primärer, humaner Monozyten mit OspA keine differentielle Desensibilisierung der untersuchten Proteine bewirkte. So konnte neben einer Suppression der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 auch eine verminderte Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β beobachtet werden. Nach einer Restimulation mit OspA war also eine supprimierte Freisetzung aller Chemokine zu beobachten (Abbildung 36).

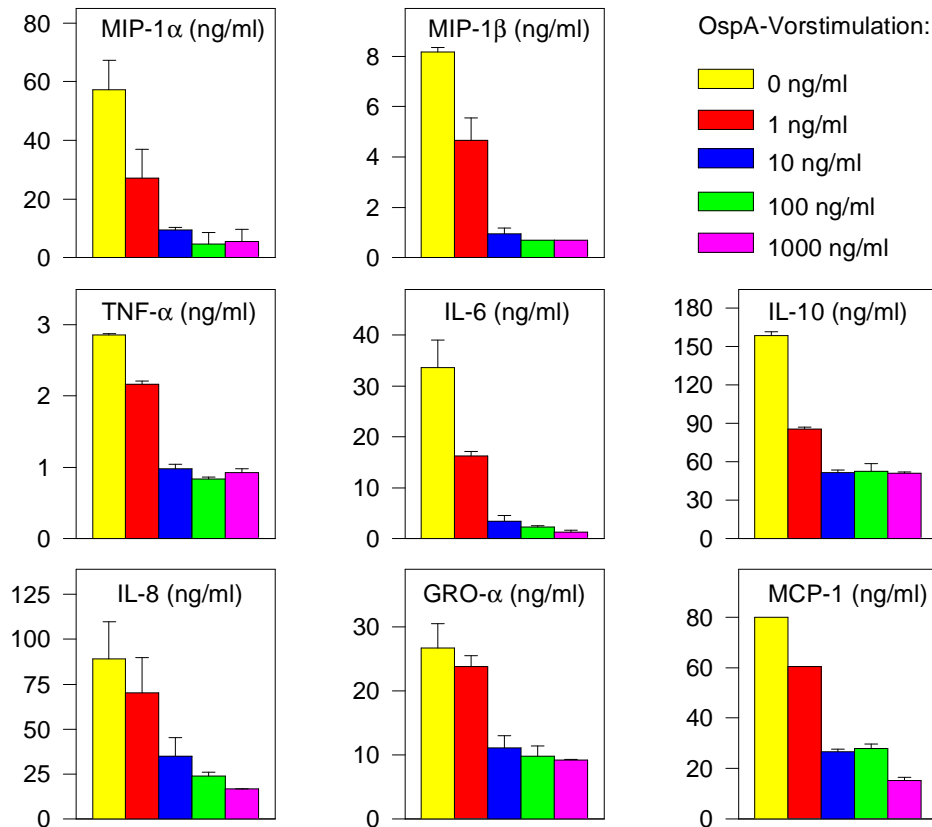


Abb.:36 Toleranzinduktion mit OspA.

Die elutrierten Monozyten wurden mit verschiedenen OspA-Dosen (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) über einen Zeitraum von 2 Tagen vorstimuliert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Überstand gewechselt und die Zellen anschließend mit einer zweiten OspA-Gabe (1000 ng/ml) über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Die Überstände wurden geerntet und im ELISA auf die spezifische Freisetzung der untersuchten Chemokinen und Zytokine analysiert. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

5.4.2. Funktionelle Analyse der Chemokinfreisetzung im Chemotaxisassay

Für die Chemotaxisversuche wurden Monozyten über einen Zeitraum von 2 Tagen mit verschiedenen OspA-Konzentrationen vorstimuliert. Anschließend wurde der Überstand gewechselt und die Zellen mit einer wiederholten OspA-Gabe für weitere 24 Stunden restimuliert. Die gewonnenen Überstände wurden auf die induzierten Monozyten-spezifischen und Neutrophilen-spezifischen chemotaktischen Aktivitäten im Chemotaxisassay analysiert.

Die Suppression der Chemokinfreisetzung nach einer Restimulation der Zellen mit OspA konnte durch die funktionelle Analyse der freigesetzten chemotaktischen Aktivitäten im Chemotaxisassay bestätigt werden. Es zeigte sich, daß das Migrationsverhalten frisch isolierter humaner Monozyten und neutrophiler Granulozyten, abhängig von der Höhe der Vorstimulation durch OspA, deutlich supprimiert war (Abbildung 37). Durch die funktionelle Analyse der Überstände konnte die Induktion unbekannter chemotaktischer Aktivitäten nach Restimulation der Zellen mit OspA ausgeschlossen werden.

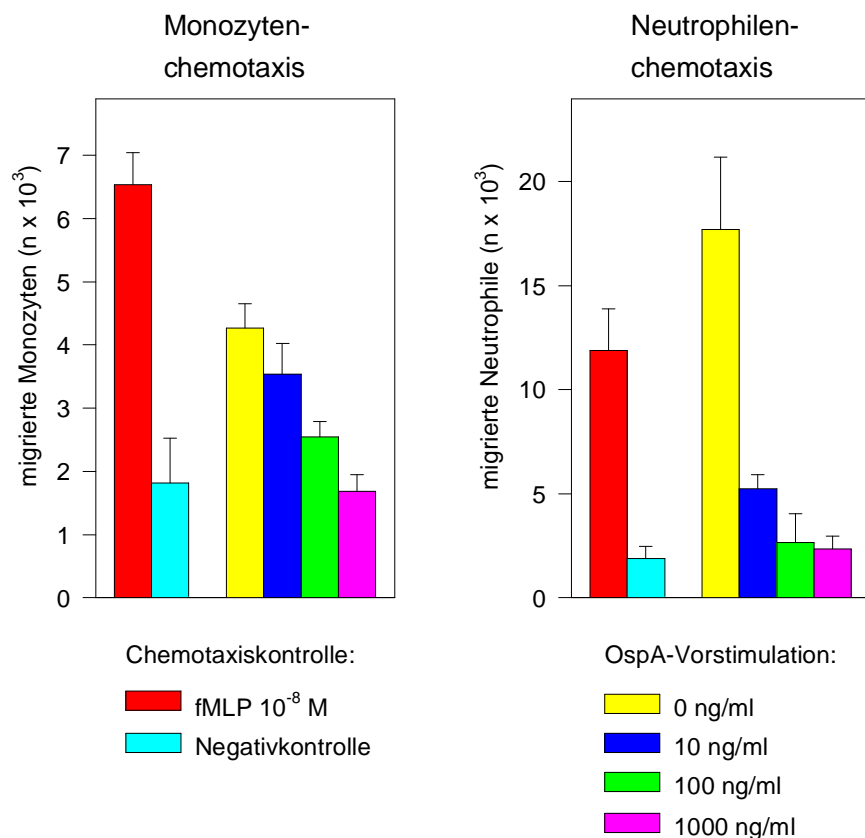


Abb.:37 Funktionelle Analyse der induzierten chemotaktischen Aktivitäten. Isolierte Monozyten wurden unter Adhärenzbedingungen über einen Zeitraum von 2 Tagen mit steigenden OspA-Konzentrationen (0 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) vorstimuliert. Anschließend wurden die Überstände gewechselt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit 1000 ng/ml OspA restimuliert. Die konditionierten Überstände wurden nach 24 Stunden geerntet und im Chemotaxisassay auf die induzierten Monozyten-spezifischen und Neutrophilen-spezifischen chemotaktischen Faktoren untersucht. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle einer gerichteten Chemotaxis fMLP (10⁻⁸ M) und als Negativkontrolle das für die Stimulation der Zellen verwendete Medium eingesetzt. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde densitometrisch (Monozyten) oder enzymatisch (Neutrophile) bestimmt. Dargestellt sind

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß die Interaktion von OspA mit humanen Monozyten eine massive Veränderung des Aktivierungszustandes der Zellen bewirkte. Die Stimulation äußerte sich durch eine massive Freisetzung der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 sowie der Chemokine IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β . Weiterhin konnte durch die morphologisch sichtbaren Veränderungen der Zellstruktur auf eine Aktivierung der Zellen nach Stimulation mit OspA geschlossen werden.

Die Restimulation humaner Monozyten mit OspA führte zu einer Suppression der Chemokin- und Zytokinfreisetzung. Diese Suppression konnte durch die funktionellen Analysen der induzierten chemotaktischen Aktivitäten im Chemotaxisassay als generelles Phänomen bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Toleranzinduktion durch LPS, führte die Vorbehandlung der Zellen mit OspA ausnahmslos zu einer Reduktion der Chemokinfreisetzung.

6. Chemokin- und Zytokinfreisetzung nach Stimulation humaner Monozyten mit Virosomen

Wie in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, induziert eine Infektion humaner Monozyten mit Influenza A-Virus selektiv Monozyten-spezifische Chemokine. Im Gegensatz dazu werden chemotaktisch Faktoren, die auf neutrophile Granulozyten wirken, supprimiert. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, welche Rolle die Infektiosität der Viren für diese beobachtete selektive Induktion der Chemokine spielt und welche viralen Schlüsselmoleküle dafür verantwortlich gemacht werden können. Da in vorangegangenen Experimenten mit inaktivierten Viren bereits die viralen Hüllproteine Hämagglutinin und Neuraminidase als verantwortliche Schlüsselmoleküle eingegrenzt werden konnten, sollten diese jetzt in ihrer natürlichen dreidimensionalen Struktur membranständig präpariert und auf ihre Chemokin-induzierenden oder

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß die Interaktion von OspA mit humanen Monozyten eine massive Veränderung des Aktivierungszustandes der Zellen bewirkte. Die Stimulation äußerte sich durch eine massive Freisetzung der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 sowie der Chemokine IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β . Weiterhin konnte durch die morphologisch sichtbaren Veränderungen der Zellstruktur auf eine Aktivierung der Zellen nach Stimulation mit OspA geschlossen werden.

Die Restimulation humaner Monozyten mit OspA führte zu einer Suppression der Chemokin- und Zytokinfreisetzung. Diese Suppression konnte durch die funktionellen Analysen der induzierten chemotaktischen Aktivitäten im Chemotaxisassay als generelles Phänomen bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Toleranzinduktion durch LPS, führte die Vorbehandlung der Zellen mit OspA ausnahmslos zu einer Reduktion der Chemokinfreisetzung.

6. Chemokin- und Zytokinfreisetzung nach Stimulation humaner Monozyten mit Virosomen

Wie in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, induziert eine Infektion humaner Monozyten mit Influenza A-Virus selektiv Monozyten-spezifische Chemokine. Im Gegensatz dazu werden chemotaktisch Faktoren, die auf neutrophile Granulozyten wirken, supprimiert. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, welche Rolle die Infektiosität der Viren für diese beobachtete selektive Induktion der Chemokine spielt und welche viralen Schlüsselmoleküle dafür verantwortlich gemacht werden können. Da in vorangegangenen Experimenten mit inaktivierten Viren bereits die viralen Hüllproteine Hämagglutinin und Neuraminidase als verantwortliche Schlüsselmoleküle eingegrenzt werden konnten, sollten diese jetzt in ihrer natürlichen dreidimensionalen Struktur membranständig präpariert und auf ihre Chemokin-induzierenden oder

6.1. Kontrolle der Virosomenpräparation

Für die Präparation der viralen Membranproteine in ihrer dreidimensionalen Struktur wurden die Hüllen von Influenza A-Viren mit Hilfe eines Detergens aufgebrochen und das virale Nukleocapsid mit der darin eingelagerten Einzelstrang-RNA über einen Zentrifugationsschritt abgetrennt. Nach der Entfernung des Detergens bildeten die Hüllmembranen, ähnlich den Micellen, wieder eine vollständige, dreidimensionale Struktur aus. Die entstandenen Virosomen enthielten als einzige virale Bestandteile die in die Hüllmembran eingelagerten transmembranen Hämagglutinin- und Neuraminidasemoleküle, sowie das der inneren Membran angelagerte Matrixprotein. Eine Infektiosität der Virosomen konnte aufgrund der fehlenden viralen RNA ausgeschlossen werden.

6.1.1. Struktur der Virosomen

Im Elektronenmikroskop wurde die Struktur der infektiösen A/PR/8-Viren, aus denen die Virosomen hergestellt wurden, mit den präparierten Virosomen verglichen (Abbildung 38). Die Virosomen zeigten eine ähnliche Struktur wie die Viren. Bei beiden Präparationen zeigten sich bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung die in die Hüllmembranen eingelagerten Spikes, die aus den Hämagglutinin- und Neuraminidaseproteinen bestehen. Auffallend war jedoch, daß die Virosomen häufig runder und regelmäßiger in der Form waren als die Viren, die z. T. sehr in ihrer Größe variierten. Eine Unterscheidung zwischen Virosomen und Viren hinsichtlich der enthaltenen oder fehlenden inneren Strukturen war jedoch nicht möglich, da das Nukleokapsid elektronenmikroskopisch nicht dargestellt werden konnte.

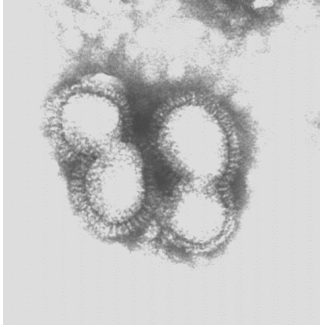
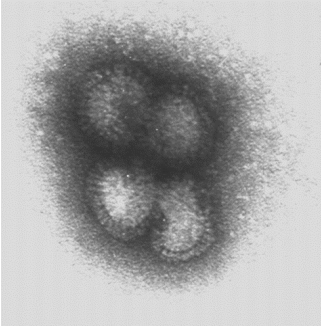
	Influenza A Virus	Virosomen
		
Hämagglutinin (HA)	+	+
Neuraminidase (NA)	+	+
Matrixprotein (M)	+	+
Nukleokapsid: Nukleoprotein (NP)	+	nicht nachweisbar
RNA-Polymerase	+	nicht nachweisbar
(-) Strang RNA	+	nicht nachweisbar

Abb.:38 Elektronenmikroskopische Aufnahme von infektiösem Influenza A Virus im Vergleich mit Virosomen.

Die Virosomen wurden wie unter Material und Methoden 2.9. beschrieben präpariert und anschließend im Vergleich mit der ursprünglichen Viruspräparation im Elektronenmikroskop bei einer 90.000-fachen Vergrößerung analysiert.

6.1.2. Infektiosität der Virosomen

Als Nachweis für die vollständig Abtrennung des Nukleokapsids und der darin enthaltenen viralen RNA bei der Präparation wurden die Virosomen im Plaque-Test überprüft. Damit sollte bestätigt werden, daß in den Virosomenpräparationen keine infektiösen Viruspartikel mehr enthalten waren.

Für die Durchführung wurden MDCK II Zellen kultiviert und anschließend mit der Virosomensuspension inkubiert. Zusätzlich wurden die Virosomen mit Trypsin vorbehandelt, um durch die Spaltung des HA-Moleküls eine optimale Voraussetzung für die Infektion der permissiven Zielzellen zu erreichen. Als Positivkontrollen wurden A/PR/8-Viren aus der ursprünglichen Präparation eingesetzt.

Vollständig fehlende Lysehöfe bei der Auswertung der Plaque-Tests zeigten an, daß die Virosomen, im Gegensatz zu den als Positivkontrollen eingesetzten A/PR/8-Viren, nicht mehr in der Lage waren, aktiv in den Zielzellen zu replizieren. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte also davon ausgegangen werden, daß die Präparation der Virosomen mit einem vollständigen Verlust der Infektiosität verbunden war.

6.1.3. Nachweis virosomaler Proteine im Dot-Blot

Bei der Virosomenpräparation wurde neben der viralen RNA auch das sie umgebende Nukleoprotein abgetrennt. Im Gegensatz dazu verblieb das membranassoziierte Matrixprotein jedoch im Inneren der sich neu ausbildenden Virosomenpartikel. Der Nachweis dieser Proteine wurde für die Qualitätsüberprüfung der präparierten Virosomen eingesetzt. Im Dot-Blot wurde untersucht, ob in den Virosomen noch Reste des Nukleoproteins nachgewiesen werden konnten und wie hoch der prozentuale Anteil im Vergleich zu den Viren noch war.

Für die Untersuchungen wurden Verdünnungsreihen der Virus- und der Virosomenpräparation im Dot-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Die Menge des aufgetragenen Nukleoproteins bzw. des Matrixproteins wurde mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht und anschließend mittels eines Röntgenfilms detektiert.

Da sich die Menge des Matrixproteins, das sich an der inneren Membranhülle befindet, nicht verändert, wurden äquimolare Konzentrationen des Proteins innerhalb der beiden Verdünnungsreihen eingestellt und verglichen. Die entsprechenden Dots für das Nukleoprotein wurden densitometrisch ausgewertet und anschließend das Verhältnis der Proteinmenge ermittelt (Abbildung 39). Dabei ergab sich, daß nur noch ca. 1% der ursprünglichen Menge des Nukleoproteins in den Virosomen enthalten war.

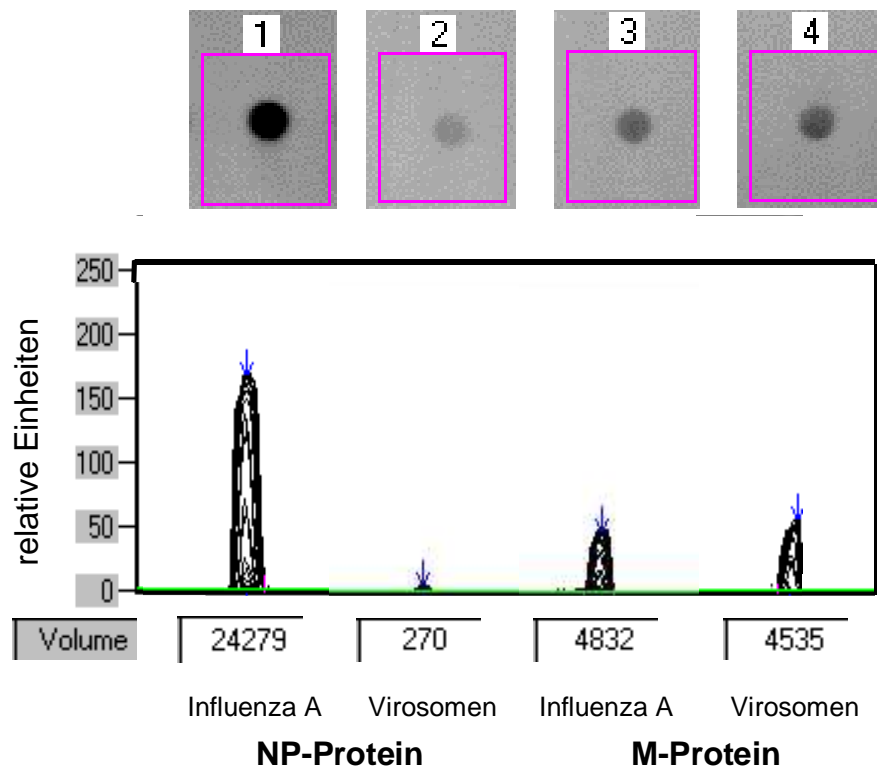


Abb.:39 Bestimmung des Nukleoproteins und Matrixproteins in infektiösen Viren und Virosomen durch Immunoblot.

Äquimolare Mengen der Virus- und Virosomenpräparation wurden auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und der Gehalt an Nukleoprotein und Matrixprotein durch spezifische Antikörper detektiert. Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden durch HRPO-konjugierte anti-Maus Antikörper und der anschließenden Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrates sichtbar gemacht. Nach der Detektion mittels eines Röntgenfilms wurden die Dots densitometrisch ausgewertet.

6.2. Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation humaner Monozyten mit Virosomen

Durch den Einsatz von Virosomen und Vergleich mit den Influenza A-Viren sollte untersucht werden, ob die durch Infektion bewirkten Effekte allein durch die Bindung der Hüllproteine Hämagglutinin und Neuraminidase an die Monozyten ausgelöst wurden, oder ob die uneingeschränkte Infektiosität des Virus die Voraussetzung für die beobachtete selektive Induktion der Chemokine war.

Dazu wurden jeweils 100 HAU (hämagglutinierende Einheiten) /ml A/PR/8 bzw. Virosomen auf $0,75 \times 10^6$ Zellen gegeben (das entsprach den üblicherweise verwendeten 2 MOI). Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Überstände gewonnen und in spezifischen ELISA's auf die freigesetzten Chemokine und Zytokine untersucht. Diese Ergebnisse wurden mit der Freisetzung LPS-stimulierter Monozyten (10 ng/ml) verglichen. Zusätzlich wurden beide Stimuli auch kombiniert eingesetzt. Eine nicht-stimulierte Negativkontrolle wurde mitgeführt, um unspezifische Einflüsse abzugrenzen.

6.2.1. Suppression der CXC-Chemokinfreisetzung nach der Stimulation mit Virosomen

In Abbildung 40 ist die Freisetzung der CXC-Chemokine IL-8 und GRO- α nach Infektion bzw. Stimulation der Monozyten mit Influenza A/PR/8 und Virosomen dargestellt. Es zeigte sich, daß LPS-behandelte Monozyten große Mengen der Chemokine freisetzen. Nach der Infektion von Monozyten mit A/PR/8 und Stimulation mit Virosomen wurde keine signifikante Produktion von IL-8 oder GRO- α beobachtet. Die freigesetzten Mengen differierten nur unwesentlich von denen der nicht-behandelten Kontrollzellen. Weiterhin bewirkte die kombinierte Stimulation der Zellen mit A/PR/8 und LPS oder Virosomen und LPS eine deutliche Reduktion der Freisetzung von IL-8 und GRO- α im Vergleich zu den allein mit LPS-behandelten Monozyten. Wie das infektiöse A/PR/8-Virus selbst supprimierten also auch die Virosomen die durch LPS induzierte Expression beider Chemokine.

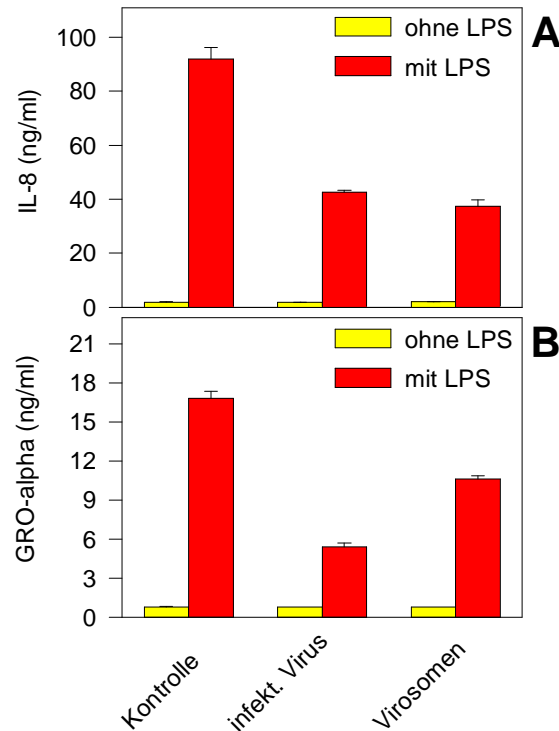


Abb.:40 Freisetzung von IL-8 (A) und GRO- α (B) aus humanen Monozyten nach Stimulation mit LPS, A/PR/8-Virus oder Virosomen.

Monozyten wurden mit LPS (10 ng/ml) stimuliert, mit 100 HAU/ml A/PR/8 infiziert oder mit 100 HAU/ml Virosomen behandelt. Zusätzlich wurde eine Kombination der beiden Stimuli eingesetzt. Eine nicht-behandelte Zellkultur diente als Negativkontrolle. Die konditionierten Überstände wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden geerntet und in spezifischen ELISA's auf die Freisetzung der CXC-Chemokine IL-8 und GRO- α getestet. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

6.2.2. Fehlende Induktion des CC-Chemokins MCP-1 durch Virosomen

Im Gegensatz zur Induktion von MCP-1 durch infektiöse Viren waren Virosomen dazu nicht in der Lage (Abbildung 41). Es zeigte sich, daß LPS-behandelte und mit A/PR/8 infizierte Monozyten große Mengen MCP-1 freisetzten. Bei einer Kostimulation wurden deutlich höhere Mengen von MCP-1 freigesetzt. Die Interaktion der Zellen mit Virosomen führte dagegen zu keiner signifikant erhöhten MCP-1-Freisetzung. Ebenso bewirkte die Kombination der Stimuli LPS und Virosomen gegenüber den mit LPS allein stimulierten Kulturen keine Erhöhung der MCP-1-Expression. Aus diesen Ergebnissen war zu schließen, daß für die

von entscheidender Bedeutung war. Die Stimulation der Zellen mit Virosomen allein war im Gegensatz dazu für die Induktion der MCP-1-Freisetzung nicht ausreichend.

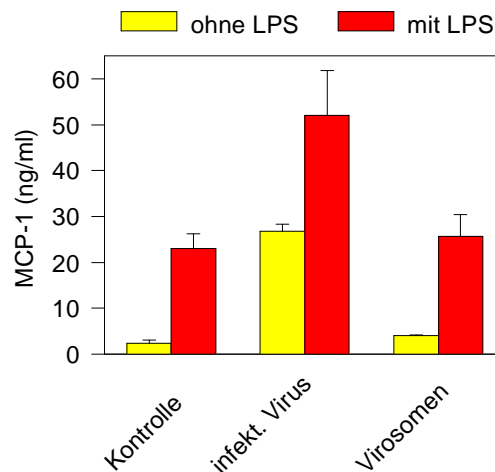


Abb.:41 Freisetzung von MCP-1 aus humanen Monozyten nach Stimulation mit LPS, A/PR/8 oder Virosomen.
Monozyten wurden mit LPS (10 ng/ml) stimuliert, mit 100 HAU/ml A/PR/8 infiziert oder mit 100 HAU/ml Virosomen behandelt. Zusätzlich wurden beide Stimuli mit LPS kombiniert eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten nicht-stimulierte Zellkulturen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Überstände gewonnen und anschließend die Freisetzung von MCP-1 im spezifischen ELISA bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

6.2.3. Fehlende Induktion proinflammatorischer Zytokine durch Virosomen

Ebenso wie für MCP-1 zeigte sich, daß Virosomen keinen Einfluß auf die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 ausübten (Abbildung 42). Wie zu erwarten war, führte die Stimulation der Zellen mit LPS zu einer starken Freisetzung, während die Infektion mit A/PR/8 oder die Stimulation mit Virosomen keine signifikante Erhöhung der Expression bewirkten. Die Kostimulation der Monozyten mit A/PR/8 und LPS zeigte gegenüber der Stimulation mit LPS allein eine leichte Erhöhung der Freisetzung. Im Gegensatz dazu bewirkte die Kombination der Stimuli LPS und Virosomen gegenüber den mit

LPS allein stimulierten Kulturen keine signifikante Veränderung der Freisetzung von TNF- α oder IL-6.

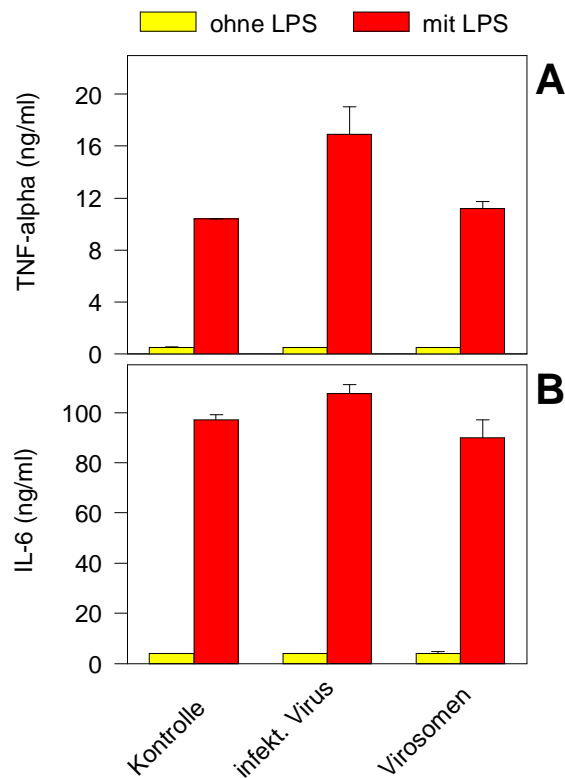


Abb.:42 Freisetzung von TNF- α (A) und IL-6 (B) aus humanen Monozyten nach Stimulation mit LPS, A/PR/8 oder Virosomen.

Monozyten wurden mit LPS (10 ng/ml) stimuliert, mit 100 HAU/ml A/PR/8 infiziert oder mit 100 HAU/ml Virosomen behandelt. Zusätzlich wurde eine Kombination der beiden Stimuli eingesetzt. Um unspezifisch induzierende Einflüsse abgrenzen zu können, wurde eine nicht-behandelte Zellkultur mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Überstände geerntet und mit Hilfe spezifischer ELISA's die freigesetzten Proteinmengen bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

6.2.4. Antikörper gegen HA heben die Virus- und Virosomen-induzierte IL-8 Suppression auf

Durch den Einsatz von Antikörpern gegen das Hämagglutininmolekül sollte anschließend untersucht werden, welches der beiden viralen Hüllproteine für die selektive Induktion der Chemokinfreisetzung verantwortlich war.

Hierfür wurden Monozyten mit Antikörpern inkubiert und anschließend mit A/PR/8 bzw. Virosomen oder LPS stimuliert. Zusätzlich wurde eine Kombination der Stimuli A/PR/8 und LPS oder Virosomen und LPS eingesetzt. Eine nicht-stimulierte Negativkontrolle und eine nur mit den Antikörpern behandelte Zellkultur wurden ebenfalls mitgeführt, um unspezifisch induzierende Einflüsse abgrenzen zu können. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die konditionierten Überstände gewonnen und die freigesetzten IL-8-Mengen durch einen spezifischen ELISA gemessen.

Die Auswertung der Versuche zeigte reproduzierbar, daß die Infektion humaner Monozyten mit A/PR/8 oder die Stimulation der Zellen mit Virosomen keine signifikante Produktion von IL-8 induzierte. Wieder kam es nach kombinierter Stimulation der Zellen mit A/PR/8 und LPS oder Virosomen und LPS zu einer deutlichen Reduktion der Freisetzung von IL-8 im Vergleich zu den allein mit LPS-behandelten Zellen. Die Vorinkubation der Zellen mit den Antikörpern alleine hatte keinen Einfluß auf die spontane oder LPS-induzierte Freisetzung von IL-8. Im Gegensatz dazu zeigte sich aber bei der Kostimulation der Zellen mit A/PR/8 und LPS unter Einfluß von anti-HA eine Aufhebung der Suppression der LPS-induzierten IL-8-Freisetzung. Die gleiche Beobachtung traf für die Stimulation der Zellen mit Virosomen und LPS in Kombination mit den Antikörpern zu. Die freigesetzten Mengen lagen jetzt im Bereich der allein mit LPS-behandelten Kontrollzellen. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, daß Antikörper gegen das virale Hüllprotein Hämagglutinin in der Lage waren, die Virus- oder Virosomen-induzierte Suppression der IL-8-Freisetzung nach einer LPS-Stimulation zu verhindern (Abbildung 43).

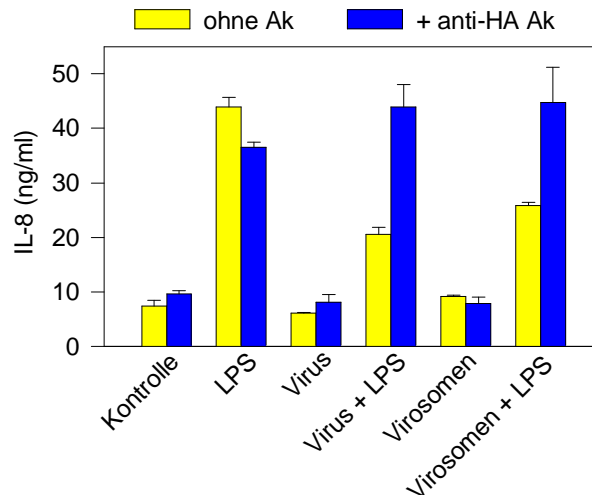


Abb.:43 Antikörper gegen Hämagglutinin führten zu einer Aufhebung der Virus- oder Virosomen-induzierten Suppression der IL-8-Freisetzung nach der Stimulation mit LPS. Monozyten wurden mit Antikörpern gegen das Hämagglutininmolekül vorinkubiert und anschließend mit LPS (10 ng/ml) stimuliert, mit 100 HAU/ml A/PR/8 infiziert oder mit 100 HAU/ml Virosomen behandelt. Zusätzlich wurde eine Kombination der jeweiligen viralen Stimuli mit LPS eingesetzt. Eine nicht-behandelte Zellkultur sowie allein mit den Antikörpern inkubierte Monozyten dienten als Negativkontrolle, um unspezifisch induzierende Einflüsse abgrenzen zu können. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die konditionierten Überstände geerntet und anschließend die Freisetzung des CXC-Chemokins IL-8 im spezifischen ELISA ermittelt. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

6.2.5. Lösliche HA-Moleküle bewirken keine Suppression der IL-8-Freisetzung

In weiteren Versuchen sollte der Einfluß der dreidimensionalen Struktur der Hämagglutininmoleküle auf die Suppression der LPS-induzierten Freisetzung der CXC-Chemokine untersucht werden. Die suppressiven Effekte von Virosomen, in denen das Hämagglutininmolekül in seiner natürlichen dreidimensionalen Struktur membranständig vorlag, wurden mit der Wirkung von löslichen HA-Molekülen verglichen.

Dazu wurden humane Monozyten mit löslichen HA-Molekülen vorinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde die induzierte IL-8-Menge im spezifischen ELISA bestimmt.

Wie in der Abbildung 44 graphisch dargestellt, zeigten die löslichen HA-Moleküle, im Gegensatz zur membrangebundenen Form, keine Suppression der

löslichen HA-Molekülen und LPS freigesetzten Mengen unterschieden sich nicht von den durch LPS allein induzierten. Lösliche HA-Moleküle allein führten zu keiner Freisetzung von IL-8, die sich von der unstimulierten Kontrolle unterschied.

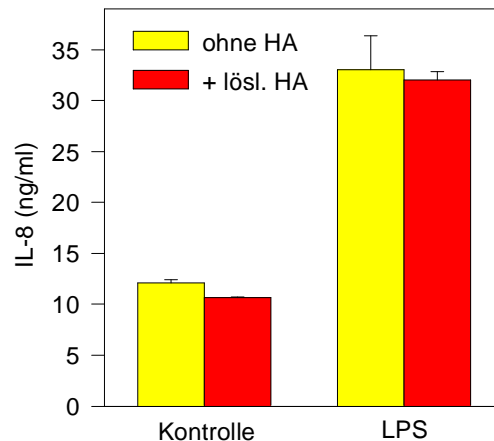


Abb.:44 Einfluß löslicher HA-Moleküle auf die Freisetzung von IL-8. Humane Monozyten wurden mit löslichen Hämagglutininmolekülen vorinkubiert und anschließend mit LPS (10 ng/ml) stimuliert. Um unspezifisch induzierende Einflüsse abgrenzen zu können, wurde eine Negativkontrolle sowie eine nur mit HA-Molekülen behandelte Zellkultur mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die konditionierten Überstände geerntet und die freigesetzten IL-8-Mengen mit Hilfe eines spezifischen ELISA bestimmt.

Die wichtigsten Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden: Die bei der Virosomenpräparation angewandte Technik ermöglichte die Isolation der viralen Hüllprotein Hämagglutinin und Neuraminidase in ihrer natürlichen membranständigen, dreidimensionalen Struktur. Diese Präparationen enthielten keine infektiösen Viruspartikel, der Anteil des Nukleoproteins und damit auch der viralen RNA war auf ca. 1% des ursprünglichen Anteils reduziert. Wie für die Infektion von humanen Monozyten mit aktivem Influenza A Virus gezeigt, führte auch die Interaktion der Zellen mit den präparierten Virosomen zu einer Suppression der LPS-induzierten Freisetzung der CXC-Chemokine IL-8 und GRO- α . Im Gegensatz dazu war die Induktion des CC-Chemokins MCP-1 abhängig von der Infektion der Zellen mit intakten Viruspartikeln. Durch die

Molekülen konnte das membranassoziierte Hämagglutininmolekül als verantwortliches Schlüsselmolekül für die beobachteten Effekte identifiziert werden.

7. Chemokinrezeptorexpression

Ob sich die Expression der Chemokinrezeptoren auf humanen Monozyten nach Stimulation verändert, sollte zunächst durch die funktionelle Analyse im Mikrochemotaxisassay untersucht werden. Hierfür mußte eine Methode etabliert werden, die eine Kultivierung ohne Adhärenz der Zellen ermöglichte. Die üblicherweise verwendeten Plastikoberflächen waren für diese Versuche ungeeignet, da stimulierte Monozyten darauf fest adhären und nicht abgelöst werden konnten, ohne die Zellstruktur wesentlich zu schädigen. Aus diesem Grund wurden die Zellen für die Analyse der Chemokinrezeptorexpression in Teflongefäßen kultiviert. Die Teflongefäße ermöglichten es, die stimulierten Monozyten zu resuspendieren, ohne die Zellstruktur oder die funktionelle Aktivität der Zellen wesentlich zu beeinflussen. Die so kultivierten Zellen wurden anschließend im Chemotaxisassay eingesetzt, und der Einfluß der Stimulation auf die Rezeptorexpression funktionell analysiert.

7.1. Kultivierung der Monozyten in Teflongefäßen

Um adhärenzfrei kultivierte Monozyten zu charakterisieren, mußten zunächst zwei wesentliche Fragestellungen analysiert werden. Zum einen mußte sichergestellt sein, daß die Stimulationsfähigkeit der Monozyten durch die Kultivierung in den Teflongefäßen nicht beeinträchtigt war. Zum anderen mußte eine der Plastikadhärenz vergleichbare Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen auch unter den Bedingungen der adhärenzfreien Kultivierung gewährleistet sein.

Molekülen konnte das membranassoziierte Hämagglutininmolekül als verantwortliches Schlüsselmolekül für die beobachteten Effekte identifiziert werden.

7. Chemokinrezeptorexpression

Ob sich die Expression der Chemokinrezeptoren auf humanen Monozyten nach Stimulation verändert, sollte zunächst durch die funktionelle Analyse im Mikrochemotaxisassay untersucht werden. Hierfür mußte eine Methode etabliert werden, die eine Kultivierung ohne Adhärenz der Zellen ermöglichte. Die üblicherweise verwendeten Plastikoberflächen waren für diese Versuche ungeeignet, da stimulierte Monozyten darauf fest adhären und nicht abgelöst werden konnten, ohne die Zellstruktur wesentlich zu schädigen. Aus diesem Grund wurden die Zellen für die Analyse der Chemokinrezeptorexpression in Teflongefäßen kultiviert. Die Teflongefäße ermöglichten es, die stimulierten Monozyten zu resuspendieren, ohne die Zellstruktur oder die funktionelle Aktivität der Zellen wesentlich zu beeinflussen. Die so kultivierten Zellen wurden anschließend im Chemotaxisassay eingesetzt, und der Einfluß der Stimulation auf die Rezeptorexpression funktionell analysiert.

7.1. Kultivierung der Monozyten in Teflongefäßen

Um adhärenzfrei kultivierte Monozyten zu charakterisieren, mußten zunächst zwei wesentliche Fragestellungen analysiert werden. Zum einen mußte sichergestellt sein, daß die Stimulationsfähigkeit der Monozyten durch die Kultivierung in den Teflongefäßen nicht beeinträchtigt war. Zum anderen mußte eine der Plastikadhärenz vergleichbare Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen auch unter den Bedingungen der adhärenzfreien Kultivierung gewährleistet sein.

7.1.1. Kultivierung in Teflongefäßen: Recovery und Zellvitalität

Die über Elutriation aufgereinigten Monozyten wurden in den Teflongefäßen über einen Zeitraum von bis zu 6 Tagen kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen resuspendiert und der prozentuale Anteil der lebenden Zellen mit Hilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt.

Die Färbungen der Zellen zur Kontrolle der Vitalität mit dem Trypanblau-Ausschlußverfahren ergab zu jedem Zeitpunkt der Untersuchungsreihen, daß mehr als 98% der resuspendierten Monozyten Trypanblau-negative, also lebende Zellen waren. Die Ausbeute der ursprünglich eingesetzten Monozyten lag zwischen 80-90%.

7.1.2. Morphologische Veränderungen

Während der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen in den Teflongefäßen kam es zu typischen Veränderungen im Streulichtverhalten und der Eigenfluoreszenz der Zellen.

Im Gegensatz zu Monozyten, die im Forward-Sideward-Scatter als eine relativ homogene Population erfaßt wurden, wiesen die Zellen nach einer Differenzierungszeit von 6 Tagen das typische Streulichtverhalten von Makrophagen auf. Aufgrund des relativ starken Vorwärtsstreulichtes, bedingt durch die Größe der Zellen und hohen Werten im 90°-Streulicht durch ihre ausgeprägte Oberflächenstruktur, stellten die differenzierten Makrophagen eine recht heterogene Zellpopulation dar (Abbildung 45A). Weiterhin auffallend war die Zunahme der Eigenfluoreszenz während der Differenzierung der Zellen. Diese unspezifische Fluoreszenzerscheinung führte zu einer Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen (Abbildung 45B).

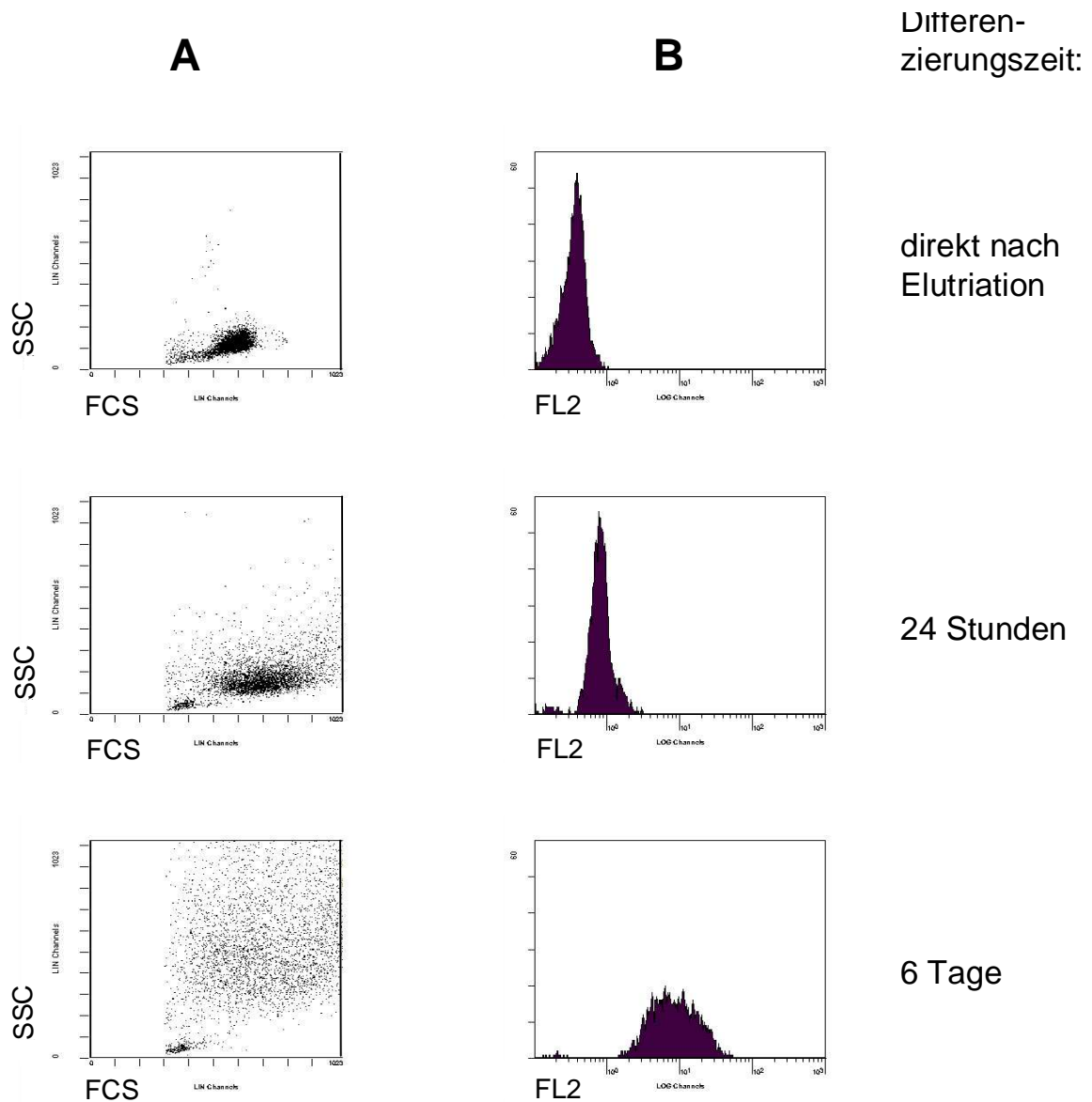


Abb.:45 FACS-Diagramme zur Charakterisierung der morphologischen Veränderungen während der Differenzierung zu Makrophagen. Humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen in Teflongefäßen kultiviert. Direkt nach Elutriation, sowie nach 1 Tag und 6 Tagen wurden die Zellen resuspendiert und im FACScan analysiert. Gezeigt sind zweidimensionale FACS-Diagramme zur Charakterisierung der Zellen durch Vorwärtsstreulicht (FSC) und 90° - Streulicht (SSC) (Abbildung 45A), sowie FACS-Histogramme zur Darstellung der Zunahme der unspezifischen Eigenfluoreszenz (Abbildung 45B).

7.1.3. Phagozytose fluoreszenzmarkierter Latexpartikel

Veränderungen der Phagozytose-Eigenschaften wurden durch die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Latexpartikel mit anschließender durchflußzytometrischer Auswertung analysiert. Gegenüber den herkömmlichen Phagozytostests besaß diese Technik den Vorteil, daß in kurzer Zeit große Zellmengen erfaßt werden konnten und somit auch kleinere Unterschiede in der Aktivität der Zellen statistisch absicherbar nachweisbar waren.

Die isolierten Monozyten wurden in den Teflongefäßen unter Standardbedingungen über einen Zeitraum von 24 Stunden, bzw. 6 Tagen kultiviert. Nach Zugabe von 50 Partikeln/Zelle aus der fluoreszenzmarkierten Latexsuspension wurde erneut für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4° C aufbewahrt, nachfolgend gut resuspendiert und elutriert. Mit diesem Schritt wurde zum einen nur lose an die Zellen gebundene Partikel abgelöst und zum anderen freie Partikel von den Zellen getrennt. Die Auswertung der Phagozytose erfolgte mittels durchflußzytometrischer Messung am FACScan. Mit der Messung konnten sowohl Aussagen über die Phagozytoserate (Anteil der Zellen, die phagozytiert hatten) als auch zum Phagozytoseindex (Anzahl aufgenommener Partikel pro Zelle) getroffen werden. Die Auswertung der Meßergebnisse zeigte, daß die über einen Zeitraum von 6 Tagen differenzierten Makrophagen im Vergleich zu den Monozyten eine deutlich gesteigerte Phagozytoserate sowie einen erhöhten Phagozytoseindex aufwiesen. Wie in der Abbildung 46 gezeigt, waren 60,3% der Makrophagen im Vergleich zu 35,8% der Monozyten phagozytisch aktiv. Eine Gegenüberstellung der einzelnen Phagozytoseraten und der Phagozytoseindices ist in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die in der Abbildung 46 beobachtende Verschiebung der unspezifischen Fluoreszenzintensität war auf die Zunahme der Eigenfluoreszenz während der Differenzierung zu Makrophagen zurückzuführen.

Tab.:1 Phagozytoseraten fluoreszenzmarkierter Latexpartikel durch Monozyten und Makrophagen.

Phagozytierte Partikel	Monozyten	Makrophagen
mind. 1	35,8%	60,3%
mehr als 1	22,3%	47,8%
mehr als 2	14,9%	39,7%
mehr als 3	10,4%	34,1%
mehr als 4	7,7%	30,0%
mehr als 5	5,7%	27,0%
mehr als 6	4,6%	24,5%

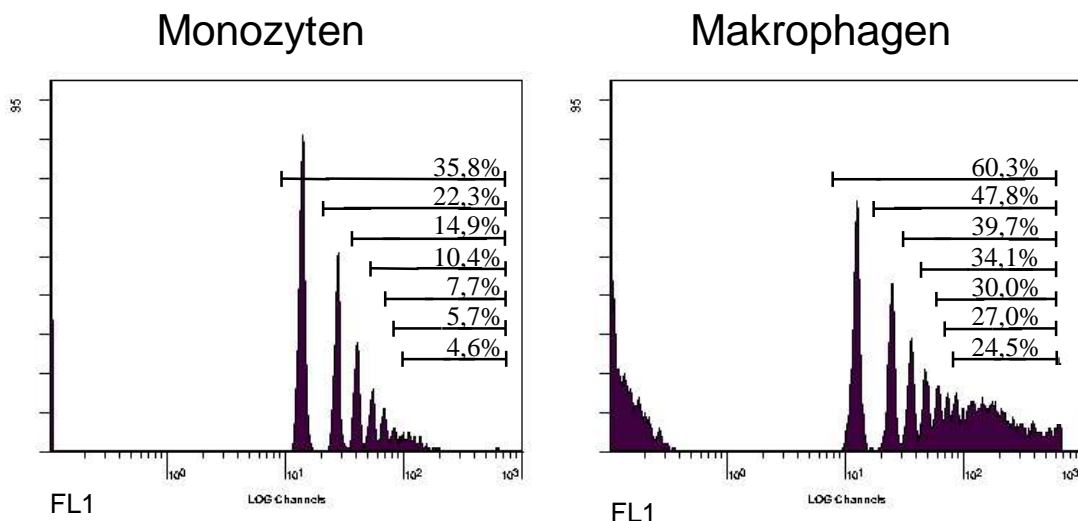


Abb.:46 FACS-Histogramm zur Darstellung der Phagozytoserate fluoreszenzmarkierter Latexpartikel durch Monozyten und differenzierte Makrophagen.

Die Phagozytoserate humaner Monozyten wurden nach Differenzierungszeiten von 24 Stunden (Monozyten) und 6 Tagen (Makrophagen) mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Latexpartikel bestimmt. Die Auswertung der durchflußzytometrischen Messung am FACScan zeigte, daß insgesamt 35,8% der Monozyten phagozytiert hatten. Die Phagozytoserate differenzierter Makrophagen betrug im Gegensatz dazu 60,3%. Weiterhin zeigten die Makrophagen eine deutliche Steigerung des Phagozytoseindex. Dargestellt sich die Meßergebnisse eines repräsentativen Spenders.

7.1.4. Chemokin- und Zytokinproduktion nach Stimulation mit LPS

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die adhärenzfreie Kultivierung der Zellen in den Teflongefäßen zu Veränderungen der Stimulationsfähigkeit führte. Die in den Teflongefäßen differenzierten Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit LPS stimuliert und die freigesetzten Chemokine und Zytokine analysiert.

Die durch Elutriation aufgereinigten Monozyten wurden in vitro durch Kultivierung in Teflongefäßen über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen in RPMI^{sup} + 5% AB-Serum zu Makrophagen ausdifferenziert. Nach 2 Stunden, 1, 3 und 8 Tagen wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Eine nicht-stimulierte Negativkontrolle wurde zu jedem Zeitpunkt mitgeführt, um unspezifische Effekte abzugrenzen. Die Überstände wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden gewonnen und im ELISA auf die Freisetzung verschiedener Chemokine und Zytokine untersucht.

Wie bereits für die unter Adhärenzbedingungen kultivierten Monozyten gezeigt werden konnte, hing die Fähigkeit der Zellen auf den LPS-Stimulus mit der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen zu antworten, stark vom Differenzierungsgrad der Zellen ab (Abbildung 47). Auch unter adhärenzfreien Bedingungen zeigte sich, daß eine fortschreitende Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen mit einer Reduktion der induzierbaren Freisetzung der meisten Chemokine und Zytokine verbunden war. Diese verminderte Freisetzung konnte für die Chemokine IL-8, GRO- α , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 und MCP-3 sowie für die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β bestätigt werden. Wie bereits nach Adhärenz der Zellen gefunden, wurde das Chemokin RANTES im Gegensatz dazu in vollständig ausdifferenzierten Makrophagen am stärksten induziert. Eine Besonderheit zeigte die Freisetzung des antiinflammatorisch wirkenden IL-10. Auch unter den Bedingungen der Teflonkultivierung kam es zu einer biphasisch verlaufenden Induktion.

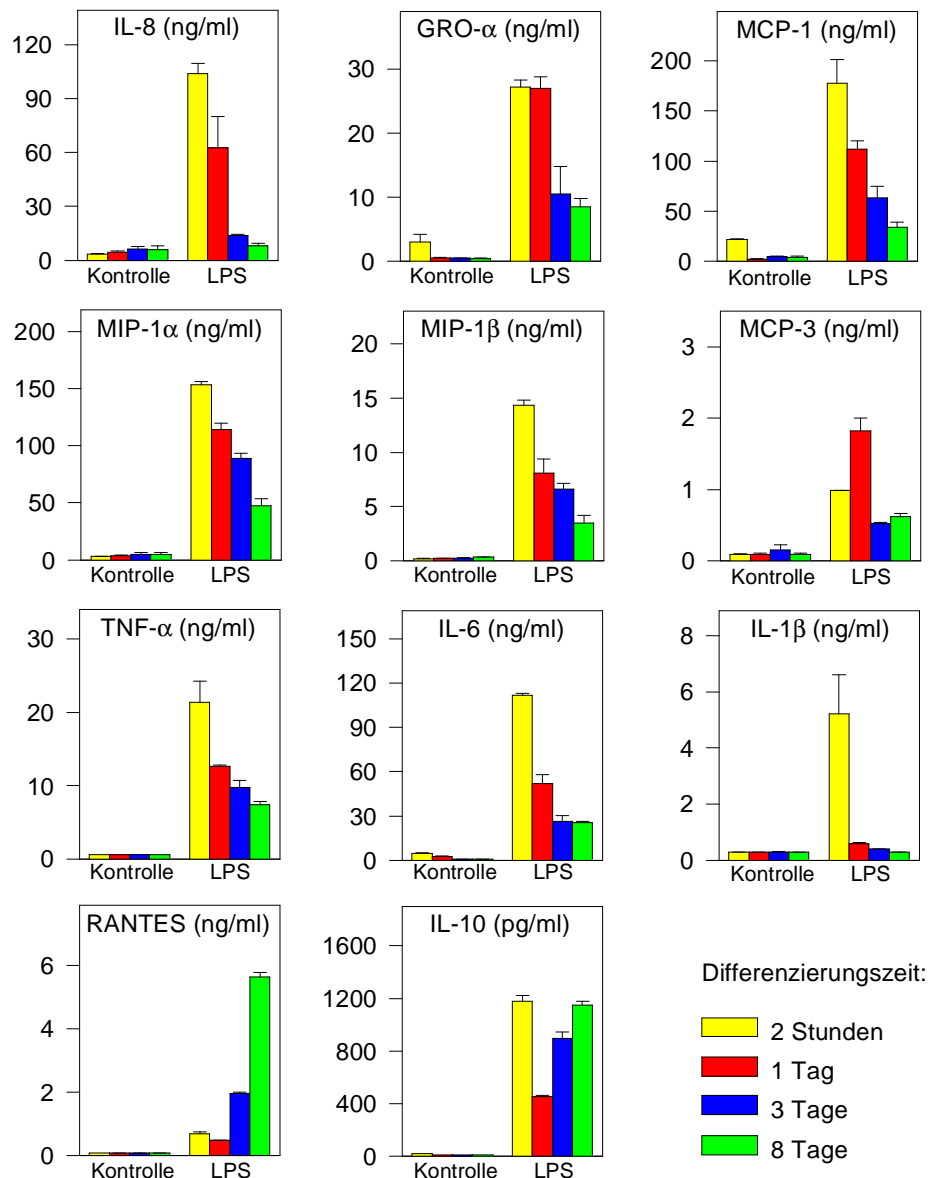


Abb.:47 Kinetik der Chemokin- und Zytokinfreisetzung humaner Monozyten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad.

Humane Monozyten wurden über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen adhärenzfrei in Teflongefäßen kultiviert. Nach Differenzierungsphasen von 2 Stunden, 1, 3 und 8 Tagen wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Als Negativkontrollen dienten nicht-stimulierte Monozytenkulturen. Die Überstände wurden nach 24 Stunden gewonnen und die Freisetzung der dargestellten Chemokine und Zytokine in spezifischen ELISA's bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD eines repräsentativen Spenders.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Monozyten nach adhärenzfreier Kultivierung in den Teflongefäßen mit Zellen nach Plastikadhärenz vergleichbar waren. Die Differenzierung äußerte sich in gleichen makrophagentypischen Veränderungen des Streulichtverhaltens, der Zunahme der Eigenfluoreszenz und einer gesteigerten Phagozytoserate. Weiterhin zeigten sich keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit durch LPS zwischen adhärenzfrei kultivierten Zellen und unter Adhärenzbedingungen differenzierten Monozyten. Als wesentlicher Vorteil dieser Methode ergab sich jedoch die Möglichkeit, Monozyten und Makrophagen zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten für die Analyse der Chemokinrezeptorexpression im funktionellen Mikrochemotaxisassay einzusetzen.

7.2. Funktionelle Analysen der Chemokinrezeptorexpression

Für die funktionellen Analysen von Veränderungen der Chemokinrezeptorexpression wurden die isolierten Monozyten unter adhärenzfreien Bedingungen in Teflongefäßen kultiviert. Nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen Stimuli, z. B. LPS, Chemokinen oder Influenza A-Viren, wurden die Veränderungen des Migrationsverhaltens der Zellen im Mikrochemotaxisassay untersucht.

7.2.1. Einfluß des Differenzierungsgrades auf das Migrationsverhalten der Monozyten

In den ersten Versuchen wurde zunächst der Einfluß des Differenzierungsgrades der kultivierten Zellen auf das Migrationsverhalten analysiert. Von besonderem Interesse war hierbei die Fragestellung, ob die Differenzierung zu Makrophagen mit Veränderungen im chemotaktischen Verhalten der Zellen verbunden war. Für die Durchführung der Versuche wurden über Elutriation isolierte humane Monozyten in RPMI^{sup} + 5% AB-Serum kultiviert. Nach verschiedenen Differenzierungszeitpunkten wurden die Zellen resuspendiert und im Mikrochemotaxisassay ihr Migrationsverhalten auf die chemotaktischen Stimuli MCP-1 und MIP-1 α untersucht. Als chemotaktischer Stimulus für eine Positivkontrolle diente fMLP. Zur Abgrenzung der unspezifischen Migration der Zellen wurde eine Mediumkontrolle eingesetzt.

Während der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen konnten Veränderungen des chemotaktischen Verhaltens gezeigt werden (Abbildung 48). Frisch isolierte humane Monozyten reagierten vor allem auf MCP-1 mit einer stark ausgeprägten Wanderung, die häufig die Werte der fMLP-Positivkontrolle erreichte. Im Verhältnis dazu war die Anzahl der Monozyten, die durch MIP-1 α chemotaktisch angelockt wurde, deutlich reduziert. Während der weiteren Differenzierung der Monozyten kam es zu einer Umkehrung dieser Verhältnisse: Bereits nach einer Differenzierungszeit von ca. 20 Stunden wurden die Zellen vor allem durch MIP-1 α in verstärktem Maße chemotaktisch angelockt, während im

Vergleich dazu das Migrationsverhalten auf den chemotaktischen Stimulus MCP-1 deutlich reduziert war. Der Stimulus fMLP zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum der Monozytendifferenzierung eine gleichbleibende chemotaktische Aktivität.

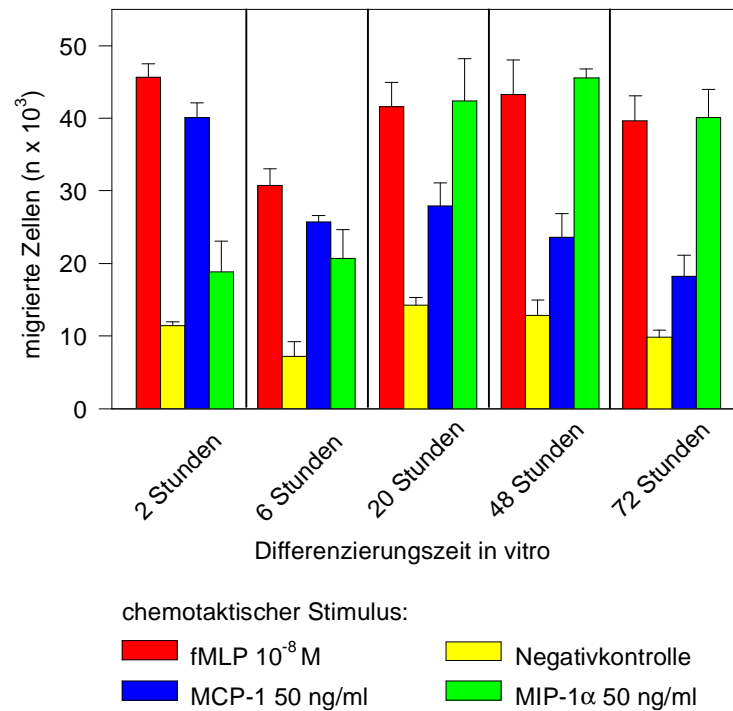


Abb.:48 Einfluß der Monozytendifferenzierung auf das chemotaktische Verhalten. Humane Monozyten wurden in Teflongefäßen über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert. Nach verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (2, 6, 20, 48 und 72 Stunden) wurden die Zellen resuspendiert und nach zweimaligem Waschen in RPMI^{sup} + 0,1% BSA im Chemotaxisassay eingesetzt. Als chemotaktische Stimuli dienten jeweils 50 ng/ml MCP-1 und MIP-1 α . Als Positivkontrolle wurde fMLP (10^{-8} M) eingesetzt. RPMI^{sup} + 0,1% BSA diente als Negativkontrolle, um die unspezifische Migration der Zellen abgrenzen zu können. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde densitometrisch bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD von vier unabhängigen Ansätzen eines repräsentativen Spenders.

7.2.2. Einfluß von Chemokinen auf das Migrationsverhalten der Monozyten

Um die allgemeine Vorstellung einer Desensibilisierung der Chemotaxis der Zellen durch Chemokine zu analysieren, wurden isolierte Monozyten unter adhärenzfreien Bedingungen kultiviert und über verschiedene Zeiträume (10 und 30 Minuten, 1, 4 und 20 Stunden) mit Chemokinen (MCP-1, MIP-1 α und RANTES) stimuliert. Die so behandelten Zellen wurden anschließend resuspendiert, und die Veränderungen des chemotaktischen Verhaltens im Mikrochemotaxisassay überprüft. Als chemotaktische Stimuli wurden hierbei ebenfalls MCP-1, MIP-1 α oder RANTES verwendet. Als Positivkontrolle diente das bakterielle Tripeptid fMLP. Zur Abgrenzung der unspezifischen Chemotaxis wurde eine Mediumkontrolle eingesetzt.

Es zeigte sich, daß die Ansprechbarkeit der vorbehandelten Zellen im Bezug auf ihre Migrationsfähigkeit gegenüber den nicht-stimulierten Kontrollzellen unverändert war. Die vorbehandelten Zellen zeigten also **keine** Desensibilisierung ihres chemotaktischen Verhaltens (Abbildung 49). Diese Beobachtung traf für alle zur Stimulation eingesetzten Chemokine zu und war unabhängig von der Dauer der jeweiligen Chemokinvorstimulation. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 für eine einstündige Vorstimulation mit MCP-1 exemplarisch dargestellt.

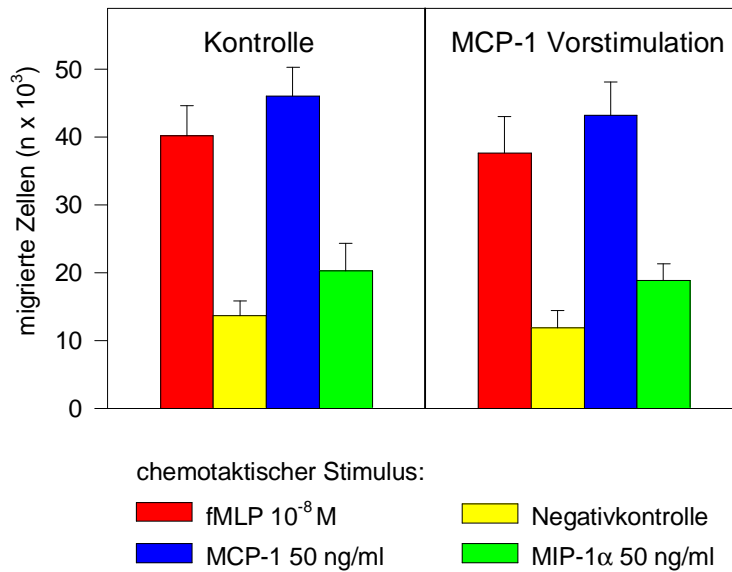


Abb.:49 Einfluß von Chemokinen auf das chemotaktische Verhalten von Monozyten. Elutrierte Monozyten wurden unter adhärenzfreien Bedingungen kultiviert und für 10 und 30 Minuten oder 1, 4 und 20 Stunden mit verschiedenen Chemokinen (50 ng/ml MCP-1, MIP-1 α oder RANTES) stimuliert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen resuspendiert und zweimal mit RPMI^{sup} + 0,1% BSA gewaschen. Diese Zellen wurden anschließend im Chemotaxisassay auf ihr Wanderungsverhalten analysiert. Als chemotaktische Stimuli dienten jeweils 50 ng/ml MCP-1 oder MIP-1 α . Weiterhin wurde das Migrationsverhalten der Zellen unter dem Einfluß von 10⁻⁸ M fMLP (Positivkontrolle) und RPMI^{sup} + 0,1% BSA (Negativkontrolle) analysiert. Die Auswertung der Anzahl der migrierten Zellen erfolgte densitometrisch. In der Abbildung sind exemplarisch die Ergebnisse einer MCP-1-Vorstimulation über einen Zeitraum von 1 Stunde gezeigt. Dargestellt sind die Meßwerte \pm SD aus vier parallelen Versuchsansätzen eines repräsentativen Spenders.

7.2.3. Einfluß von LPS auf das Migrationsverhalten der Monozyten

Um Veränderungen der Chemokinrezeptorexpression nach Aktivierung zu analysieren, wurde das Migrationsverhalten LPS-stimulierter Monozyten untersucht.

Die durch Elutriation aufgereinigten und unter adhärenzfreien Bedingungen kultivierten Monozyten wurden über einen Zeitraum von 44 Stunden mit LPS (10 ng/ml) stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 4, 8, 20 und 44 Stunden) wurden die Zellen resuspendiert und ihr chemotaktisches Verhalten gegenüber nicht-stimulierten Kontrollzellen im Mikrochemotaxisassay untersucht. Als chemotaktische Stimuli dienten MCP-1 und MIP-1 α . Weiterhin wurde eine

Positivkontrolle (10^{-8} M fMLP) sowie eine Negativkontrolle (RPMI^{sup} + 0,1% BSA) eingesetzt.

Die LPS-stimulierten Monozyten zeigten im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen eine transiente, differentielle Desensibilisierung ihres chemotaktischen Verhaltens (Abbildung 50). Die Stimulation der Monozyten mit LPS führte im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kontrollzellen nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde zu keiner Veränderung der Zellwanderung (Abbildung 50A). Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden zeigte sich jedoch eine deutliche Suppression der Wanderung der Zellen auf die chemotaktischen Stimuli fMLP und MIP-1 α (Abbildung 50B). Im weiteren Verlauf der Inkubation kam es zu einer vollständigen Erholung der Wanderungsfähigkeit der stimulierten Zellen auf den chemotaktischen Stimulus fMLP, während sich die Suppression der Zellwanderung auf den Stimulus MIP-1 α nur teilweise regenerieren konnte (Abbildung 50E). Im Gegensatz dazu waren über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Veränderungen der Migrationsfähigkeit LPS-stimulierter Zellen auf den chemotaktischen Stimulus MCP-1 zu beobachten.

Wie in weiteren Versuchen gezeigt werden konnte, war die Entwicklung und der Verlauf der transienten, differentiellen Desensibilisierung unabhängig von einer wiederholten LPS-Stimulation (nicht dargestellt). Hierfür wurden die Zellen nach der ersten LPS-Stimulation alle weiteren 12 Stunden mit der gleichen LPS-Dosis behandelt. Auch hier zeigte sich nach 4 Stunden eine Suppression der Migrationsfähigkeit der Zellen auf die Stimuli fMLP und MIP-1 α . Die Restimulation hatte jedoch keinen Einfluß auf die Erholung der Wanderungsfähigkeit. Im weiteren Verlauf der Untersuchung kam es zu einer vollständigen bzw. teilweisen Erholung der Zellwanderung auf die Stimuli fMLP und MIP-1 α . Auch in diesen Versuchen zeigte sich das Migrationsverhalten der Zellen auf den chemotaktischen Stimulus MCP-1 unverändert.

Gleiche Ergebnisse fanden sich auch für LPS-Konzentrationen bis 100 ng/ml (nicht dargestellt).

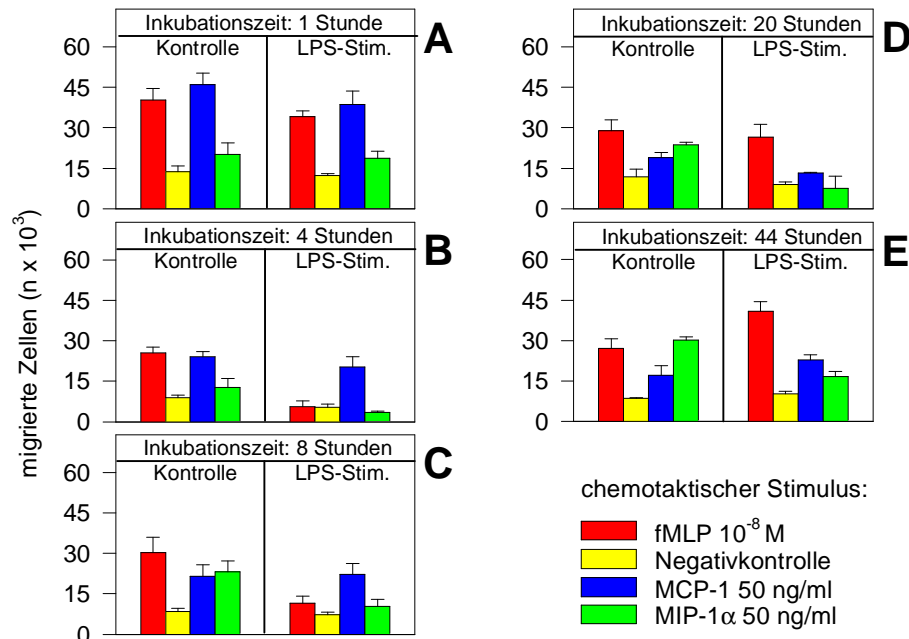


Abb.:50 Einfluß von LPS auf das chemotaktische Verhalten von Monozyten. Elutrierte Monozyten wurden unter adhärenzfreien Bedingungen in Teflongefäßen kultiviert und für 1, 4, 8, 20 und 44 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen resuspendiert und zweimal in RPMI^{sup} + 0,1% BSA gewaschen. Anschließend wurde das Wanderungsverhalten dieser Zellen im Vergleich zu parallel kultivierten, nicht-stimulierten Zellen analysiert. Als chemotaktische Stimuli dienten MCP-1 und MIP-1 α (50 ng/ml). Als Positivkontrolle wurde fMLP (10^{-8} M), als Negativkontrolle RPMI^{sup} + 0,1%BSA eingesetzt. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde densitometrisch ermittelt. Dargestellt sind die MW von vier unabhängigen Ansätzen \pm SD eines repräsentativen Spenders.

7.2.4. Einfluß von Influenza A-Viren auf das Migrationsverhalten primärer Monozyten

Zur Untersuchungen des Migrationsverhaltens virusinfizierter Zellen wurden humane Monozyten in Teflongefäßen kultiviert und über einen Zeitraum von 20 Stunden mit 2 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Weiterhin wurden durch UV-Bestrahlung oder durch Erhitzen auf 56°C inaktivierte Influenza A-Viren als Äquivalent von 2 MOI zur Stimulation der Zellen eingesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 4, 8, 12 und 20 Stunden) nach der Infektion wurden die Zellen resuspendiert und das chemotaktische Verhalten der Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen analysiert. Als chemotaktische Stimuli wurden jeweils 50 ng/ml MCP-1 oder MIP-1 α eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde wieder 10^{-8} M

fMLP, als Negativkontrolle RPMI^{sup} + 0,1% BSA eingesetzt. Um den Einfluß des Vitalitätsverlustes auszuschließen, wurde die Zellsuspension auf gleiche Konzentrationen lebender Zellen eingestellt.

Diese Versuche zeigten eine drastische Reduktion der Wanderung virusinfizierter Zellen als Antwort auf die eingesetzten Chemokine (Abbildung 51). Bereits 4 Stunden nach der Infektion mit aktivem Influenza A Virus brach die Migrationsfähigkeit der virusinfizierten Zellen auf die chemotaktischen Stimuli MCP-1 und MIP-1 α zusammen. Im Gegensatz dazu war das Migrationsverhalten der Zellen auf den Stimulus fMLP im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen unverändert (Abbildung 51B). Erst nach einer Infektionszeit von 12 Stunden verringerte sich die Anzahl der durch fMLP angelockten Zellen (Abbildung 51D).

Im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen zeigten die mit inaktivierten Viren stimulierten Monozyten zunächst nur geringfügige Veränderungen hinsichtlich ihres chemotaktischen Verhaltens. Erst nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden wurden Unterschiede im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kontrollzellen sichtbar (Abbildung 51E). Bei den stimulierten Zellen zeigte sich eine Suppression der Ansprechbarkeit durch MCP-1, während durch den chemotaktischen Stimulus MIP-1 α verstärkt Zellen angelockt wurden. Diese ausgeprägte Umkehrung der Zellwanderung auf die Stimuli MCP-1 und MIP-1 α deutete auf eine beschleunigte Ausdifferenzierung der Zellen zu Makrophagen durch die Interaktion mit inaktivierten Viren hin.

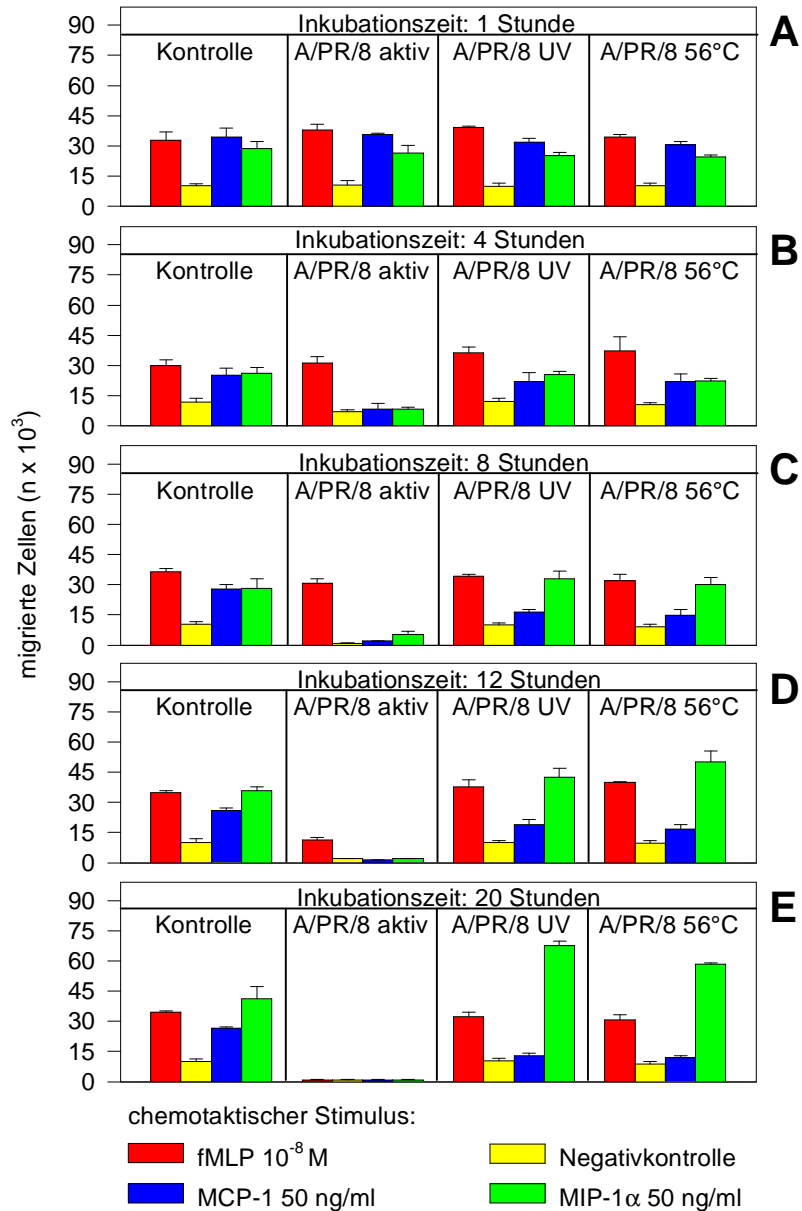


Abb.:51 Einfluß von Influenza A/PR/8 auf das chemotaktische Verhalten von Monozyten. Humane Monozyten wurden unter adhärenzfreien Bedingungen in Teflontgefäßen kultiviert. Die Zellen wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert oder mit einem Äquivalent verschieden inaktivierter Influenza A Viren (UV-Bestrahlung oder Erhitzen auf 56° C für 30 Minuten) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 1, 4, 8, 12 und 20 Stunden wurden die Zellen resuspendiert und zweimal mit RPMI^{sup} + 0,1% BSA gewaschen. Die Zellsuspensionen wurden mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlußverfahrens auf gleiche Konzentrationen lebender Zellen eingestellt. Anschließend wurde das chemotaktische Verhalten dieser Monozyten im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollzellen im Mikrochemotaxisassay untersucht. Als chemotaktische Stimuli dienten MCP-1 und MIP-1 α (50 ng/ml), sowie fMLP (10^{-8} M) (Positivkontrolle) und RPMI^{sup} + 0,1% BSA (Negativkontrolle). Die Anzahl der migrierten Zellen wurde densitometrisch ermittelt. Dargestellt sind die Meßwerte \pm SD aus vier parallelen Versuchsansätzen eines repräsentativen Spenders.

7.2.5. FACS-Analyse der Chemokinrezeptorexpression Influenza A/PR/8 infizierter humaner Monozyten

Mit Hilfe rezeptorspezifischer Antikörper wurde durch FACS-Analysen untersucht, ob die im funktionellen Mikrochemotaxisassay beobachteten Veränderungen des Wanderungsverhaltens virusinfizierter Monozyten durch eine Verringerung der Chemokinrezeptordichte bedingt war. Für diese Analysen wurden spezifische Antikörper gegen die Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5 eingesetzt.

Für die Durchführung der Versuche wurden humane Monozyten in Teflongefäßen kultiviert und über einen Zeitraum von 4 Stunden mit 2 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Parallel wurden durch Erhitzen auf 56° C inaktivierte Viren eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 und 4 Stunden wurden die Zellen resuspendiert und die Expression der Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5 im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollzellen unter Verwendung der spezifischen Antikörper untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels durchflußzytometrischer Messung am FACScan.

Die Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen ergaben eine umgekehrte Korrelation zwischen der Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5 auf der Oberfläche und dem beobachteten Wanderungsverhaltens der virusinfizierten Monozyten. Es zeigte sich, daß die Infektion der Zellen mit Influenza A/PR/8 im Vergleich zu den Kontrollzellen nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden zu einer deutlichen Zunahme der untersuchten Rezeptorexpression führte (Abbildung 52). Die beobachtete Suppression des Wanderungsverhaltens der virusinfizierten Zellen war also nicht durch eine Reduktion der Rezeptorexpression bedingt. Weiterhin bewirkte die Stimulation der Zellen mit inaktivierten Viren in diesem Beobachtungszeitraum keine Veränderungen der Expressionsdichte für die Rezeptoren CCR 2 und CCR 5. Diese Befunde unterstützen die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen hinsichtlich des unveränderten chemotaktischen Verhaltens dieser Zellen.

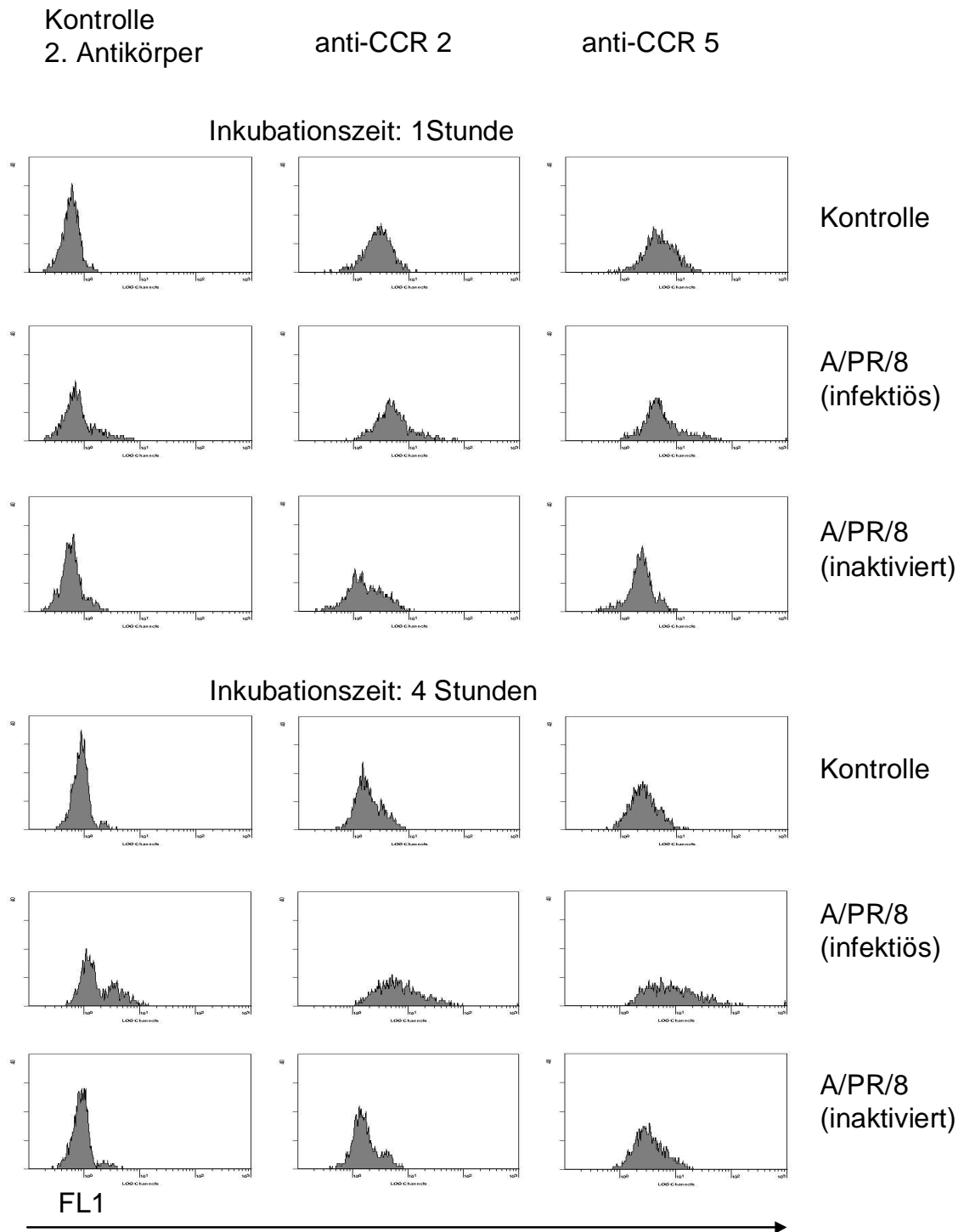


Abb.:52 FACS-Analyse des Einflusses von Influenza A/PR/8 auf die Chemokinrezeptorexpression. Elutrierte Monozyten wurden unter adhärenzfreien Bedingungen kultiviert und über einen Zeitraum von 1 und 4 Stunden mit 2 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Gleichzeitig wurden Zellkulturen mit inaktivierten Viren (30 Minuten, 56° C) stimuliert. Nicht behandelte Kulturen dienten als Kontrollzellen. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellen resuspendiert und zweimal mit PBS^{def} + 1% FCS gewaschen. Für die FACS-Färbung wurden 1×10^5 Zellen mit den spezifischen Antikörpern inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines zweiten FITC-konjugierten, anti-Kaninchen Antikörpers. Die Zellen wurden zuletzt noch zweimal gewaschen und in 1%iger Formaldehydlösung fixiert. Die Auswertung erfolgte mittels durchflußzytometrischer Messung am FACScan. Pro Versuchsansatz wurden dabei 5000 Zellen analysiert.

Die wichtigsten Ergebnisse zur Chemokinrezeptorexpression können wie folgt zusammengefaßt werden: Während der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen veränderte sich das chemotaktische Verhalten. Monozyten reagierten auf MCP-1 besonders stark. Im Gegensatz dazu wurden Makrophagen vor allem durch MIP-1 α chemotaktisch angelockt. Die Inkubation der Zellen mit Chemokinen bewirkte **keine** Desensibilisierung für einen nachfolgenden chemotaktischen Stimulus. Weiterhin zeigte sich, daß eine LPS-Stimulation eine transiente, differentielle Desensibilisierung der Chemotaxis bewirkte: Eine kurzzeitige Suppression der Zellwanderung auf die Stimuli fMLP und MIP-1 α stand einer unveränderten Migrationsfähigkeit der Zellen auf den Stimulus MCP-1 gegenüber. Die Inkubation humaner Monozyten mit Influenza A/PR/8 führte bereits in einer sehr frühen Phase der Infektion zu einer verstärkten Expression der Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5. Trotzdem war die Wanderungsfähigkeit dieser Zellen auf die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α drastisch reduziert war. Im Gegensatz dazu hatte die Stimulation mit inaktivierten Viren nur sehr geringfügige Auswirkungen auf das chemotaktische Verhalten der Zellen und die Expression der Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5.

IV. Diskussion

Monozyten/Makrophagen erfüllen eine bedeutende Funktion bei Entzündungsreaktionen und der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen. Durch ihre Fähigkeit zur Freisetzung immunmodulatorischer Moleküle, wie z. B. der Zytokine IL-6 (Interleukin 6) oder TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), beeinflussen sie aktiv die Regulation einer Immunantwort. Weiterhin regulieren sie durch die Sekretion chemotaktisch wirkender Proteine, wie z. B. IL-8 (Interleukin 8) oder MCP-1 (Monozyten chemotaktisches Protein 1), die Einwanderung immunkompetenter Zellen in ein Entzündungsgebiet. Im Rahmen von bakteriellen und viralen Infektionen kontrollieren Monozyten und Makrophagen somit entscheidend das Ausmaß, die Kinetik der Vermehrung und die Ausbreitung der verschiedenen Krankheitserreger.

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die durch bakterielle oder virale Infektionen induzierten chemotaktische Aktivitäten sowie die Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit von dem Differenzierungsgrad der Monozyten untersucht werden.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, führt die Vorbehandlung von Monozyten mit niedrigen LPS-Dosen zu einer Suppression der Freisetzung der inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α , wenn die Zellen mit einer zweiten LPS-Dosis restimuliert wurden (Ziegler-Heitbrock et al., 1992; Fahmi et al., 1996). Darüberhinaus sollte analysiert werden, welche Auswirkungen die Restimulation humaner Monozyten mit verschiedenen bakteriellen Modulinen auf eine veränderte Induktion von Chemokinen und Zytokinen hatte.

Das histologische Bild einer Influenza A-Infektion ist geprägt durch die ausschließliche Einwanderung mononuklearer Zellen in das Entzündungsgebiet. Als molekularer Mechanismus hierfür ist die selektive Freisetzung von Monozyten-spezifischen Chemokinen nach Influenza A Virus-Infektionen verantwortlich (Sprenger et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die für diese selektive Induktion verantwortlichen viralen Bestandteile

Virosomen eingesetzt, die nur die in die Hüllmembran eingelagerten HA- und NA-Moleküle, sowie das an die innere Membran angelagerte M-Protein als definierte virale Bestandteile enthalten.

Als weiterer Schwerpunkt wurde im Rahmen dieser Arbeit die Veränderung der Chemokinrezeptorexpression während der Differenzierung der Monozyten und nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Chemokinen, dem bakteriellen Endotoxin LPS, sowie nach Infektion mit A/PR/8, vor allem auf funktioneller Ebene untersucht.

1. Die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach Stimulation mit LPS oder Infektion mit Influenza A-Virus ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Monozyten

Die unter in vitro Bedingungen kultivierten Monozyten zeigen eine von der Dauer der Kultivierung abhängige Differenzierung zu Makrophagen (Gessani et al., 1993; Haq et al., 1986). Diese Differenzierungen sind charakterisiert durch Veränderungen der Zellmorphologie (Ganther et al., 1997), der veränderten Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen (Brugger et al., 1991) sowie der gesteigerten Aktivität Makrophagen-spezifischer Enzyme, wie z. B. der unspezifischen Esterase oder der sauren Phosphatase (Ganther et al., 1997). Die spezifischen Faktoren, die eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen induzieren, sind bisher noch nicht bekannt. Eine entscheidende Rolle scheinen bei diesen Vorgängen allerdings verschiedene Serumfaktoren zu spielen (Bruggner et al., 1991).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion von Chemokinen und Zytokinen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Monozyten unter

Elutriation aufgereinigte humane Monozyten über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen in Serum-haltigem Medium zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte zum einen unter Adhärenzbedingungen in Plastikschaalen oder, unter Vermeidung dieses zusätzlichen Stimulus, in Teflongefäßen. Im Anschluß an die jeweilige Differenzierungszeit erfolgte die Stimulation der Zellen mit LPS. Die Bestimmung der freigesetzten Chemokine und Zytokine erfolgte aus den konditionierten Überständen mittels ELISA.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, daß die Fähigkeit der Monozyten auf einen LPS-Stimulus mit einer Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen zu antworten, stark vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig war (Abbildungen 1-4, 47). Die fortschreitende Differenzierung der Zellen war für die meisten der analysierten Chemokine und Zytokine mit einer reduzierten Freisetzung verbunden, und zwar der Chemokine IL-8, GRO- α , MCP-1, MCP-3, MIP-1 α und MIP-1 β sowie der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6. Im Gegensatz dazu wurde das CC-Chemokin RANTES in vollständig ausdifferenzierten Makrophagen am stärksten induziert. Hieraus war zu schließen, daß die Reduktion der anderen Chemokine und Zytokine nicht durch einen Verlust der Vitalität der Zellen verursacht war, sondern auf eine durch die Differenzierung bedingte funktionelle Veränderung der Zellen zurückgeführt werden konnte. Eine Besonderheit zeigte unter diesen Bedingungen die Freisetzung des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10. Hier kam es im Verlauf der Differenzierung zu einer biphasisch verlaufenden Induktion, die zu einer vorübergehenden Reduktion der Proteinfreisetzung führte. Erst im weiteren Verlauf der Kultivierung entwickelte sich wieder eine vollständige Induzierbarkeit der Freisetzung. Diese Veränderungen der Chemokin- und Zytokinfreisetzung während der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen konnten sowohl unter Adhärenzbedingungen in den Plastikschaalen als auch unter den adhärenzfreien Kultivierungsbedingungen in den Teflongefäßen beobachtet werden. Hieraus war zu schließen, daß eine Kultivierung in den Teflongefäßen die Stimulationsfähigkeit der Monozyten nicht beeinträchtigte. Die Analyse der morphologischen Veränderungen sowie die gezeigte Steigerung der Phagozytoseeigenschaften läßt auf eine der Plastikadhärenz vergleichbare

Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen in Teflongefäßen zu schließen.

adhärenzfreien Kultivierung schließen. Die beobachteten Veränderungen der Monozyten während der Zelldifferenzierung waren also unabhängig von einer durch die Adhärenz an Plastikoberflächen induzierten Stimulation. Mit der Kultivierung der Monozyten in den Teflongefäßen ergab sich jedoch die Möglichkeit, die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Differenzierung oder nach Stimulation schonend zu isolieren, ohne die Zellstruktur zu schädigen oder die funktionelle Aktivität durch eine unspezifische Stimulation der Zellen zu beeinflussen.

Bestätigt wurden die Ergebnisse der veränderten Proteinfreisetzung durch die Analysen der mRNA-Expression von unter Adhärenzbedingungen kultivierten Zellen (Abbildung 5). Die zunehmende Differenzierung der Zellen bewirkte eine Reduktion der durch LPS induzierbaren IL-8- und MCP-1-Expression. Im Gegensatz dazu zeigte die RANTES mRNA-Expression die höchste Aktivität in vollständig ausdifferenzierten Makrophagen.

Wie die funktionelle Analyse im Mikrochemotaxisassay weiterhin zeigte, führte die reduzierte Freisetzung chemotaktischer Aktivitäten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Monozyten zu einer drastischen Reduktion der Zellwanderung als Antwort auf die induzierten Überstände (Abbildung 6). Die auf Protein- und mRNA-Ebene beobachtete gesteigerte RANTES-Freisetzung durch differenzierte Makrophagen war jedoch nicht ausreichend, um die ausgeprägte Reduktion der anderen CC-Chemokine im funktionellen Monozyten-chemotaxisassay zu kompensieren.

Die Freisetzung von Zytokinen nach Stimulation mit LPS aus humanen Monozyten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. So wird einerseits beschrieben, daß sich die Fähigkeit zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 mit zunehmender Differenzierung der Zellen vermindert. Diese Reduktion der Freisetzung konnte durch eine 48-stündige Vorbehandlung der Zellen mit IFN- γ aufgehoben werden. Die TNF- α -Freisetzung war nach IFN- γ -Vorbehandlung sogar deutlich gesteigert (Burchett et al., 1988). Von anderen Arbeitsgruppen wird im Gegensatz dazu eine

TNF- α und IL-6 beschrieben, die nicht mit einer vermehrten Akkumulation der TNF- α - oder IL-6-mRNA verbunden war (Gessani et al., 1993). Wieder andere Arbeitsgruppen berichten von einer differentiellen Veränderung der Zytokinsekretion. So wurde beschrieben, daß ausdifferenzierte Zellen nach Stimulation mit LPS weniger IL-1 β und IL-6 und mehr TNF- α freisetzen sollten als frisch isolierte Monozyten (Scheibenbogen et al., 1991).

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Veränderungen der Chemokinfreisetzung oder der biphasisch verlaufenden Freisetzung des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 während der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen, wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Das nach Stimulation mit LPS gefundene Expressionsmuster zeigten die Monozyten auch nach Infektion mit Influenza A/PR/8. Auch hier konnte eine veränderte Chemokin- und Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit von dem Differenzierungsgrad der Zellen beobachtet werden, die mit einer Reduktion der meisten der untersuchten Proteine verbunden war (Abbildungen 7 und 8). Im Gegensatz dazu zeigte sich aber auch bei der Infektion der Zellen mit A/PR/8-Viren, daß RANTES in ausdifferenzierten Makrophagen am stärksten induziert werden konnte.

Die beobachtete Reduktion der TNF- α -Freisetzung nach Infektion mit A/PR/8 in Abhängigkeit von der Differenzierungszeit konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Auch hier führte die Infektion von in vitro differenzierten Monozyten mit A/PR/8 bei Kostimulation mit LPS zu einer Reduktion der TNF- α -Freisetzung (Bender, 1992).

Die funktionelle Analyse der durch Influenza A Virus-Infektion induzierten Überstände im Chemotaxisassay bestätigte die auf Proteinebene gezeigte Reduktion der Freisetzung von CC-Chemokinen (Abbildung 9). Auch hier war die gesteigerte RANTES-Freisetzung nicht ausreichend, um die Reduktion der anderen CC-Chemokine auszugleichen.

Die in dieser Arbeit beobachtete fehlende Induktion der Freisetzung von CXC-Chemokinen nach Infektion humaner Monozyten mit Influenza A/PR/8 bestätigt die Ergebnisse von Sprenger et al. (1996). Durch die funktionellen

konnte zusätzlich gezeigt werden, daß eine Infektion der Monozyten mit A/PR/8 zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung die Freisetzung von IL-8 oder anderen Neutrophilen-spezifischen chemotaktischen Faktoren bewirkte. Diese Analyse dokumentiert bei Virusinfektionskrankheiten eine differentielle Induktion bestimmter Chemokine als molekulare Grundlage für die Ausbildung des spezifischen, mononuklearen Zellinfiltrates in virusinfiziertem Gewebe. Sowohl auf proteinchemischer als auch auf funktioneller Ebene konnte übereinstimmend gezeigt werden, daß die virusinduzierten chemotaktischen Aktivitäten die selektive Ausbildung eines mononuklearen Zellinfiltrates bewirken. Durch fehlende Neutrophilen-spezifische chemotaktische Aktivitäten scheint die Einwanderung neutrophiler Granulozyten auszubleiben.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß es während der in vitro Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zu Veränderungen hinsichtlich der Induzierbarkeit der Chemokin- und Zytokinfreisetzung kam. Welche Faktoren die beobachtete differentielle Sekretion beeinflussen und inwieweit diese Befunde auf die in vivo Situation übertragen werden können, muß noch näher untersucht werden. Einen entscheidenden Einfluß hierauf haben sicherlich verschiedene Serumfaktoren wie z. B. IFN- γ (Philip et al., 1986) oder CSFs (Cannistra et al., 1988).

Eine generelle Suppression der Zellvitalität durch ein Nachlassen in vivo fördernder Einflüsse während der Kultivierung kann aufgrund der gesteigerten Freisetzung von RANTES und IL-10 durch ausdifferenzierte Makrophagen als Ursache ausgeschlossen werden.

Möglicherweise kann die differentielle Freisetzung der Chemokine und Zytokine während der Differenzierung mit einer veränderten funktionellen Aktivität der Zellen in Zusammenhang gebracht werden: In einem Entzündungsgebiet sollte eine der Hauptaufgaben eingewanderter Monozyten darin bestehen, durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen immunmodulatorische Funktionen zu steuern, sowie die Rekrutierung weiterer Zellen sicherzustellen. Hierfür wird die Bereitstellung großer Mengen Chemokine und Zytokine benötigt. Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion verändern sich die Anforderungen an die funktionelle Aktivität der Makrophagen. Ihr neues Aufgabengebiet umfasst vor

allein die Beseitigung der geschädigten Gewebezellen und der eingedrungenen Mikroorganismen und die Präsentation der phagozytierten Bestandteile über MHC II-Moleküle an T-Lymphozyten sowie die anschließende suppressive Regulation der Immunantwort. Diese Funktionen der Zellen werden durch die gesteigerte Phagozytoserate und die erhöhte Expression von Enzymen, die am intrazellulären Abbau beteiligt sind, sowie durch die Induktion der RANTES-Freisetzung erfüllt, das selektiv für die Anlockung von CD 4⁺ T-Zellen vom Memorytyp verantwortlich ist (Schall et al., 1990). Die Suppression der Immunantwort wird durch die verstärkte Expression des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 erreicht. Die Freisetzung inflammatorisch wirkenden Zytokine, wie z. B. TNF- α , IL-1 β oder IL-6 sowie von Chemokinen, die für eine ständige Einwanderung neuer Zellen aus der Blutbahn verantwortlich sind, wird im Verlauf der Entzündungsreaktion zunehmend supprimiert. Die hier in vitro beobachteten Veränderungen der Chemokin- und Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Monozyten entsprechen den in diesem Modell aufgestellten Anforderungen, die eine in vivo ablaufende Entzündungsreaktion an die eingewanderten Monozyten als wichtige immunregulatorische Zellpopulation stellt.

2. Monozyten reagieren auf die Stimulation mit den bakteriellen Modulinen MALP-2 und OspA mit einer gesteigerten Chemokin- und Zytokinfreisetzung

In einem weiteren Teil der Untersuchungen dieser Arbeit wurde der Einfluß von MALP-2 und OspA auf die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch humane Monozyten untersucht. Bei diesen beiden bakteriellen Modulinen handelt es sich um isolierte Membran-Lipoproteine aus *Mycoplasma fermentans* (Mühlradt et al., 1997) bzw. aus *Borrelia burgdorferi* (Ebnet et al., 1997).

Mykoplasmen haben meistens keine bedeutende klinische Relevanz, da akute

allerdings Hinweise, daß Mykoplasmen an der Entstehung von chronischen Entzündungsprozessen, wie z. B. der rheumatoiden Arthritis (Schaeffer et al., 1996) oder einer nicht durch Gonokokken bedingten Urethritis (Horner et al., 1993; Jensen et al., 1993) durch persistierende Infektionen beteiligt sind. Weiterhin sollen Mykoplasmen eine Rolle bei der Pathogenese von AIDS spielen (Lo et al., 1991). Da Mykoplasmen aufgrund fehlender Erbinformationen eine Reihe von Stoffwechselvorgängen nicht durchführen können, sind sie darauf angewiesen, als extrazelluläre Parasiten auf den Schleimhäuten ihrer Wirte zu wachsen. Große Probleme bereiten Mykoplasmen in Zellkulturen, wo sie häufig als störende Kontaminanten vorhanden sind und eine Aktivierung der Zellen verursachen können (Sprenger, 1989).

Borrelien gehören zur Familie der Spirocheten und sind für das Krankheitsbild der Lyme-Disease verantwortlich. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine starke systemische Entzündungsreaktion und die mitunter lebenslange Persistenz der Erreger.

Die Stimulation humaner Monozyten mit MALP-2 führte zu einer Aktivierung der Zellen. Diese Aktivierung war bereits an den morphologischen Veränderungen der Zellstruktur deutlich zu erkennen (Abbildung 26) und kann mit der nach einer LPS-Stimulation verglichen werden. Die stimulierten Zellen zeigten eine erhöhte Adhärenz sowie die verstärkte Ausbildung von Zytoplasmafortsätzen. Die Stimulation der Monozyten mit MALP-2 führte zu einer dosisabhängigen Induktion der Chemokin- und Zytokinfreisetzung (Abbildung 27). Im einzelnen konnte die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β sowie der proinflammatorisch wirkenden Zytokine TNF- α und IL-6 nachgewiesen werden. Für eine signifikante Induktion der Chemokine waren bereits geringe MALP-2-Konzentrationen ausreichend. Im Gegensatz dazu wurden 10-100-fach höhere Mengen MALP-2 für die Induktion der Zytokinfreisetzung benötigt. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine parallele Freisetzung der Chemokine und Zytokine. Bereits 4 Stunden nach Stimulation ließen sich signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle feststellen. Das Maximum der Freisetzung war 12-24 Stunden nach der Stimulation erreicht. Der zeitliche Verlauf der

Freisetzung und die Höhe der durch MALP-2 induzierten Chemokine und Zytokine war einer Stimulation der Zellen mit LPS (10 ng/ml) vergleichbar (Abbildung 28). Auffallend war die fast vollständig fehlende Induktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Nur durch sehr hohe MALP-2-Konzentrationen konnte eine geringfügige IL-10-Freisetzung induziert werden. Weiterhin kam es zu keiner signifikanten Freisetzung von RANTES, da diese Versuche mit undifferenzierten Monozyten durchgeführt wurden. Auf mRNA-Ebene zeigte sich aber auch in diesen Zellen eine geringfügige Induktion der RANTES-Expression, die jedoch zu keiner meßbaren Sekretion des Proteins führte (Abbildung 29).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß aus Mykoplasmen aufgereinigte Lipoproteine eine Makrophagen-stimulierende Aktivität (MSA) besitzen (Quentmeier et al., 1990; Mühlradt et al., 1991). Aufgrund der Vielzahl der in Mykoplasmen enthaltenen Lipoproteine konnte die stimulierende Aktivität jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden. Für diese als MDHM (mycoplasma-derived high molecular weight material) bezeichneten Fraktionen wurde die Induktion von TNF- α , IL-1, IL-6, Prostaglandinen und NO in Monozyten und Makrophagen aufgezeigt. Darüberhinaus führt eine MDHM-Exposition in Makrophagen zu einer verminderten MHC II-Expression, was mit einer Inhibition der T-Zell vermittelten Immunantwort verbunden ist (Frisch et al., 1996).

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde die Isolation eines weiteren Lipoproteins aus Mykoplasmen berichtet. Dieses 48 kD große Lipoprotein war in der Lage, in humanen Monozyten die Sekretion von TNF- α und IL-1 β zu induzieren (Kostyal et al., 1994).

Für das aus Mykoplasmen aufgereinigte MALP-2-Molekül und sein sythetisch hergestelltes Dipalmitoyl MALP-2-Homolog konnte die Induktion der NO-Freisetzung in murinen Makrophagen nachgewiesen werden (Mühlradt et al., 1997). Eine Deacylierung des Moleküls führte zum Verlust der Zytokin-induzierenden Eigenschaften.

Eine Induktion von Chemokinen durch Mykoplasmen oder aus Mykoplasmen isolierten Lipoproteinen ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden.

Ebenso unklar sind die molekularen Mechanismen, die zu einer Induktion der

spielt, wie bei einer LPS-Stimulation, die Phosphorylierung von Tyrosinresten eine entscheidende Rolle (Rawadi et al., 1996). Wie gezeigt werden konnte, bewirkt die Inhibition der Tyrosinkinase durch Herbimycin A oder Genistein eine Inhibition der Mykoplasmen-vermittelten Freisetzung von IL-1 β und TNF- α in THP-1 Zellen und Monozyten. Die nach Mykoplasmen-Stimulation phosphorylierten Proteine unterschieden sich aber in ihrem Molekulargewicht deutlich von denen nach einer LPS-Stimulation. Hieraus war zu schließen, daß die beobachtete Induktion der Chemokine und Zytokine durch Mykoplasmen und LPS auf unterschiedlichen molekularen Mechanismen beruhen muß.

Ein spezifischer Rezeptor, der die durch Mykoplasmen oder die isolierten Lipoproteine induzierten Effekte vermittelt, konnte bisher noch nicht charakterisiert werden.

Die beobachtete Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch humane Monozyten zeigt, daß das aus Mykoplasmen isolierte Lipoprotein MALP-2 in der Lage ist, das unspezifische Immunsystem zu stimulieren. Durch die Stimulation der Chemokin- und Zytokinsynthese trägt das MALP-2-Molekül also aktiv zur Auslösung einer Entzündungsreaktion sowie zur Rekrutierung weiterer immunkompetenter Zellen in das Entzündungsgebiet bei. Weiterhin wird durch diese Ergebnisse deutlich, welche Probleme sich bei einer Mykoplasmen-Kontamination in Zellkulturen ergeben können. Auch hier wird eine Aktivierung der Zellen erfolgen, die unvorhersehbare Einflüsse und schwerwiegende Auswirkungen auf die Zuverlässigkeit der erhobenen Daten haben können.

Vergleichbare Ergebnisse wie nach der Stimulation mit MALP-2 konnten durch die Behandlung humaner Monozyten mit OspA, dem wichtigsten Oberflächenantigen von *B. burgdorferi*, beobachtet werden. Auch hier führte die Stimulation zu einer bereits morphologisch deutlich sichtbaren Aktivierung der Zellen (Abbildung 33) und einer gesteigerten Sekretion von Chemokinen und Zytokinen (Abbildung 34). Durch eine OspA-Stimulation konnte die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β sowie der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 in Monozyten induziert werden. Wieder waren für eine signifikante Induktion der

Chemokine. Die Ausbildung einer heftigen proinflammatorischen Reaktion kann durch die leichte Induzierbarkeit der Chemokinfreisetzung verhindert werden, wenn die eingewanderten Zellen in der Lage sind, geringfügige Keimzahlen erfolgreich zu eliminieren.

Wie der Vergleich mit einer LPS-Stimulation (10 ng/ml) zeigte, waren bereits 100 ng/ml OspA ausreichend, um eine zeitlich und mengenmäßig äquivalente Freisetzung der Chemokine zu induzieren (Abbildung 35). Im Gegensatz zu den Versuchen mit MALP-2 war bei der Stimulation mit OspA eine relativ hohe Freisetzung von IL-10 durch die Monozyten zu beobachten. Auch nach Stimulation mit OspA konnte in den undifferenzierten Monozyten keine RANTES-Freisetzung induziert werden.

Verantwortlich für die starke Entzündungsreaktion, die durch eine Borrelien-Infektion hervorgerufen wird, ist vermutlich der Lipidanteil des OspA-Moleküls. Eine Deacylierung ist mit dem Verlust der Zytokin-induzierenden Eigenschaften verbunden (Ebnet et al., 1997). Wie bereits von einigen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, ist das Lipoprotein OspA in der Lage, in verschiedener Zelltypen die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, sowie der erhöhten Expression von Transkriptionsfaktoren zu induzieren. In der Literatur ist unter anderem bereits die Induktion von IL-6, IL-8 und verschiedenen Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen (Wooten et al., 1996), von TNF- α in Monozyten (Radolf et al., 1995) und von RANTES, MCP-1, IL-8, GRO- α , IP-10, Mig und Adhäsionsmolekülen in Fibroblasten und Endothelzellen (Ebnet et al., 1997) beschrieben worden. OspA soll auch eine Stimulation von neutrophilen Granulozyten (Morrison et al., 1997) und B-Zellen (Weis et al., 1994) bewirken. Bestätigt werden die Ergebnisse der OspA-induzierten Chemokinfreisetzung durch den Nachweis der direkten Induktion von Chemokinen (IL-8, GRO- α , RANTES, MCP-1 und MIP-1 α) nach Infektion humaner Monozyten mit aktiven *Borrelia burgdorferi* (Sprenger et al., 1997).

Welche genauen molekularen Mechanismen zu einer Induktion der Chemokin- und Zytokinfreisetzung durch OspA oder intakte Borelien führen, ist bisher noch nicht näher untersucht worden. Eine entscheidende Rolle scheint allerdings der

dieses Faktors im Kern bei gleichzeitiger Erhöhung der Expression seines Inhibitors I κ B- α in OspA-stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die Induktion der Chemokine MCP-1 und IP-10 durch die Anwendung der NF- κ B-Inhibitoren Calpain inhibitor I, N- α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl-keton (TLCK) und Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) blockiert werden (Ebnet et al., 1997).

Über welchen zellulären Rezeptor oder Rezeptorkomplex die für die Aktivierung notwendigen Signale weiterleitet werden, ist bisher noch unbekannt.

Die gefundenen Daten zeigen deutlich, daß das OspA-Molekül ein starker Induktor der Chemokin- und Zytokinfreisetzung ist, die maßgeblich an der Regulation der Immunantwort sowie der Rekrutierung von Leukozyten zu einer Entzündungsstelle beteiligt sind. Die induzierten Chemokine spielen mit Sicherheit eine zentrale Rolle bei der Regulation der Borrelien-induzierten Entzündungsreaktion und der nachfolgenden Immunantwort.

3. Veränderte Induktion von Chemokinen und Zytokinen nach Restimulation humaner Monozyten mit bakteriellen Modulinen

Die Restimulation humaner Monozyten mit LPS bewirkt eine differentielle Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung

Die Vorbehandlung humaner Monozyten mit niedrigen LPS-Dosen führte zu einer Suppression der Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, wie z. B. TNF- α oder IL-6, wenn die Zellen mit einer zweiten LPS-Gabe restimuliert wurden (Abbildung 10). Das Gleiche konnte auch für eine Gruppe von Chemokinen gezeigt werden (Abbildung 11). Die Freisetzung der CC-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES war bei einer Restimulation der Zellen mit LPS abhängig von der Höhe des ersten Stimulus deutlich supprimiert. Im Gegensatz dazu zeigte

sich bei der Expression der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 keine Suppression nach einer wiederholten LPS-Stimulation (Abbildung 12). Die Freisetzung einiger dieser Chemokine war in Abhängigkeit von der Höhe der ersten Stimulation sogar erhöht und nicht supprimiert. Wie die Kinetik weiterhin zeigte, bewirkte die Vorstimulation der Zellen mit LPS bereits nach 2-4 Stunden eine anhaltende Suppression der Zytokinfreisetzung, die über den gesamten Untersuchungszeitraum von 5 Tagen andauerte. Bei den Chemokinen, die eine Toleranzinduktion zeigten, trat dieser Effekt vergleichsweise verzögert auf. Für eine vergleichbare Induktion von Toleranz wurden höhere LPS-Dosen benötigt als für die Zytokine. Aber auch hier war eine supprimierte Freisetzung über den gesamten Untersuchungszeitraum zu beobachten. Die Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 waren über den gesamten Beobachtungszeitraum auch bei einer Vorstimulation mit Dosen bis zu 10 ng/ml LPS nicht desensibilisierbar (Abbildungen 13, 14 und 15). Die fehlende Desensibilisierung dieser Chemokine war also nicht auf eine zu geringe Vorstimulation der Zellen zurückzuführen.

Eine intrazelluläre Anreicherung der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES oder den Zytokinen TNF- α , IL-6 und IL-10 in den Toleranz-induzierten Zellen konnte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die gezeigte differentielle Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit der LPS-Vorstimulation war also auch nicht durch eine herabgesetzte Freisetzung bedingt.

Die auf Proteinebene beobachtete differentielle Desensibilisierung der humanen Monozyten konnte durch die Analysen der mRNA-Expression bestätigt werden (Abbildung 16). Wie die Northern Blot-Analysen ergaben, zeigte die Expression der TNF- α - und MIP-1 α -mRNA eine von der Höhe der Vorstimulation abhängige deutlich reduzierte Stimulierbarkeit. Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression von MCP-1 und IL-8 nicht desensibilisierbar, es zeigte sich sogar eine unveränderte bzw. eine von der Höhe der LPS-Vorstimulation induzierte Anreicherung der mRNA nach der Restimulation mit LPS.

Die Ergebnisse der funktionellen Analyse der Toleranz-induzierten Überstände im Mikrochemotaxisassay bestätigten ebenfalls die beobachtete differentielle Induktion der Chemokine. Aufgrund der unbeeinflussten Freisetzung der CXC-

Granulozyten als Antwort auf die Toleranz-induzierten Überstände unverändert. Das gleiche konnte für das Migrationsverhalten frisch isolierter humaner Monozyten gezeigt werden, die vor allem auf MCP-1 mit einer stark ausgeprägten Chemotaxis antworten. Im Gegensatz dazu war die Migration differenzierter Makrophagen, die besonders durch MIP-1 α chemotaktisch angelockt werden, als Antwort auf die Überstände deutlich reduziert (Abbildung 17).

Die Restimulation der Zellen mit PMA oder Zymosan zeigte eine unbeeinflusste Freisetzung aller untersuchter Chemokine und Zytokine (Abbildung 18). Die freigesetzten Mengen lagen hierbei immer im Bereich der nicht vorstimulierten Kontrollzellen. Das spricht für eine LPS-spezifische differentielle Desensibilisierung und eine refraktäre Phase der Zellen nach der ersten LPS-Stimulation kann somit ausgeschlossen werden.

Die Suppression der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. von TNF- α oder IL-6 nach Restimulation von humanen Monozyten mit LPS, wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Ziegler-Heitbrock et al., 1992; Fahmi et al., 1996). Untersuchungen der in vivo Situation bestätigen diese Beobachtungen (Goto et al., 1997; Erroi et al., 1993). Die genauen molekularen Mechanismen, die für die Induktion der Toleranz verantwortlich gemacht werden können, sind bisher noch nicht vollständig bekannt. Unter anderem wird eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B diskutiert (Ziegler-Heitbrock et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, daß sich in den Toleranz-induzierten Zellen suppressives p50/p50-Homodimer bildet. Das Homodimer kann zwar an die DNA binden, ist aber nicht in der Lage, die Gentranskription zu initiieren.

Inwieweit die Induktion der Toleranz über die Internalisation des LPS-Rezeptors CD 14 reguliert ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen konnte gezeigt werden, daß die Vorstimulation der Zellen sogar eine verstärkte CD 14-Expression auf der Zelloberfläche bewirkte (Ziegler-Heitbrock et al., 1994). Im Gegensatz dazu wurde von anderen Arbeitsgruppen berichtet, daß es nach der LPS-Vorstimulation zu einer Erniedrigung der Expressionsdichte kam (Mengozi et al., 1993; Fahmi et al., 1993).

In der Literatur wird allerdings übereinstimmend von der Möglichkeit zur

in vitro als auch in vivo gezeigt werden konnte, verhinderte die Inkubation der vorstimulierten Zellen mit GM-CSF, IFN- γ oder mit IL-12 die Suppression der Freisetzung von TNF- α und IL-6 nach LPS-Reexposition (Bundschuh et al., 1997; Randow et al., 1997; Docke et al., 1997; Matic et al., 1992; Haas et al., 1990).

Die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe bestätigen die in dieser Arbeit gezeigte differentielle Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung durch eine LPS-Restimulation: In murinen Makrophagen konnte hier ebenfalls eine differentielle Genexpression beobachtet werden. Die Vorbehandlung der Zellen bewirkte eine Suppression der IP-10-, D8-, TNF- α -, IL-1 β - und der D3-Expression. Im Gegensatz dazu war die Expression der Gene TNFR-2 und D2 nicht desensibilisierbar (Henricson et al., 1993).

Das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 ist ein möglicher Mediator der differentiellen Desensibilisierung

Die für LPS gezeigte differentielle Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung konnte durch eine Vorstimulation der Monozyten mit IL-10 nachgeahmt werden (Abbildungen 19, 20 und 21). Eine von der Höhe der IL-10-Vorinkubation abhängige Suppression der LPS-induzierten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 sowie der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES wurde gefunden. Wie nach Vorbehandlung mit LPS war aber auch hier die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 bei der Restimulation der Zellen unbeeinflusst. Das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 scheint aufgrund dieser Ergebnisse bei der beobachteten differentiellen Desensibilisierung der Genexpression als indirekter suppressiver Mediator eine entscheidende Rolle zu spielen. Bei den durchgeführten Versuchen fiel jedoch die prozentuale Suppression der MIP-1 α - und TNF- α -Freisetzung bei der Vorstimulation der Zellen mit IL-10 im Vergleich zu einer Vorbehandlung mit LPS deutlich schwächer aus. Weiterhin lag bei der Restimulation der IL-10-vorbehandelten Zellen die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 immer im Bereich der nicht-vorstimulierten Kontrollen. Bei den Versuchen mit

Vorstimulation abhängige verstärkte Freisetzung gezeigt. Am Mechanismus der differentiellen Genregulation scheinen deshalb neben IL-10 noch weitere, indirekte Mediatoren, wie z. B. TGF- β , beteiligt zu sein.

Diese Ergebnisse werden durch die Veröffentlichung einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt: Die Vorstimulation mit IL-10 und TGF- β führte zu einer Suppression der LPS-induzierten Freisetzung von TNF- α . Weiterhin konnte von dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß Antikörper gegen IL-10 und TGF- β die Ausbildung der LPS-induzierten Toleranz verhindern können (Randow et al., 1995).

Das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 scheint bei der Vermittlung der differentiellen Desensibilisierung der Genexpression als indirekter Mediator eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die Restimulation humaner Monozyten mit den bakteriellen Modulinen MALP-2 oder OspA führt zu einer generellen Desensibilisierung der Genexpression aller untersuchter Zytokine und Chemokine

Im Gegensatz zur LPS-Toleranzinduktion kam es nach Restimulierung humaner Monozyten mit MALP-2 zu einem anderen Desensibilisierungsmuster. Sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene führte die Vorstimulation der Zellen mit MALP-2 zu einer dosisabhängigen Suppression der Freisetzung aller untersuchter Chemokine und Zytokine (Abbildungen 30 und 31). Es kam also nicht zur Induktion einer differentiellen Desensibilisierung. Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten bei einer Toleranzinduktion mit LPS, führte die Restimulation mit MALP-2 auch zu einer Suppression der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1. Wie bei den Versuchen der LPS-Reexposition ergab sich eine unbeeinflusste Freisetzung der untersuchten Proteine nach einer Restimulation der MALP-2-vorbehandelten Zellen mit PMA oder Zymosan (Abbildung 32). Der beobachteten Effekte der Desensibilisierung sind also ein Stimulus-spezifisches Phänomen und nicht durch eine refraktäre Phase der Zellen zu erklären.

Gleiche Ergebnisse konnten nach Vorstimulation humaner Monozyten mit OspA

Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung (Abbildung 36). Die Restimulation humaner Monozyten mit OspA führte neben der Reduktion der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 sowie der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES also auch zu einer dosisabhängigen Suppression der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1. Die generelle Suppression der Chemokinfreisetzung nach OspA-Reexposition konnte durch die funktionelle Analyse der chemotaktischen Aktivitäten in den Überständen bestätigt werden (Abbildung 37): Abhängig von der Höhe der OspA-Vorstimulation zeigte sich das Migrationsverhalten sowohl von neutrophilen Granulozyten als auch frisch isolierter Monozyten deutlich supprimiert. Eine Induktion bisher noch unbekannter chemotaktischer Aktivitäten durch die Restimulation mit OspA konnte somit ausgeschlossen werden.

Die Induktion von Toleranz durch MALP-2 oder OspA ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Ob unterschiedliche Signaltransduktionswege oder genregulatorische Mechanismen für die beobachteten unterschiedlichen Desensibilisierungsmuster von MALP-2 und OspA im Vergleich mit LPS verantwortlich gemacht werden können, wird Gegenstand weiterer molekularbiologischer Analysen sein.

Die beobachtete differentielle Desensibilisierung der Chemokinfreisetzung durch die verschiedenen bakteriellen Moduline bietet erstmalig die Möglichkeit, die erfolgreiche Eradikation oder eine Persistenz verschiedener Erreger zu erklären: Im Fall einer Entzündungsreaktion, die durch Bakterien ausgelöst wird, die als wesentlichen Membranbestandteil LPS enthalten, gewährleistet die unbeeinflusste Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 die ständige Rekrutierung frischer Leukozyten aus der Blutbahn. Die neu eingewanderten Zellen sind durch die uneingeschränkte Fähigkeit zur Freisetzung immunregulatorischer Moleküle, wie z. B. TNF- α oder IL-6, in der Lage, die Entzündungsreaktion bis zur vollständigen Eliminierung der Krankheitserreger aufrechtzuerhalten. Im Gegensatz dazu könnte die generelle Suppression der Chemokin- und Zytokinfreisetzung durch Membran-assoziierte Moleküle (z. B. MALP-2 oder OspA) persistierender Krankheitserreger für eine unzureichende Immunantwort verantwortlich sein. Die eingeschränkte Freisetzung aller Chemokine verhindert

Entzündungsgebiet. Damit wäre der Organismus nicht in der Lage, die Entzündungsreaktion bis zur vollständigen Eliminierung der Bakterien aufrecht zu erhalten. Als weitere negative Auswirkung kommt es bei persistierenden Krankheitserregern durch die Aktivierung „zufällig“ eingewanderter Zellen zu einer ständigen, aber schwachen Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF- α . Diese ständige, unterschwellige Aktivierung kann für die Schädigung von umliegenden Gewebezellen, wie z. B. der Synovialzellen im Fall der rheumatoiden Arthritis, verantwortlich sein und somit wesentlich zu dem typischen Krankheitsbildern persistierender, chronischer Entzündungen beitragen.

Unterstützt wird diese Hypothese durch weitere Ergebnisse: Die Vorstimulation humaner Monozyten mit LTA's (Lipoteichonsäuren) führte ebenfalls zu einer differentiellen Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung. Für die Versuche wurden LTA's aus verschiedenen gram positiven Bakterien, die unter normalen Umständen keine Persistenz zeigen, für die Vorstimulation eingesetzt. In Analogie zu den Ergebnissen der LPS-Toleranzinduktion wurde auch hier die Freisetzung der Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 nach einer wiederholten Stimulation mit diesen Modulinen **nicht** supprimiert.

Die Zelllinien Mono Mac 6 und THP-1 eignen sich nicht als Ersatz für primäre Monozyten zur Analyse der LPS-induzierten Toleranz

In keiner der untersuchten Zelllinien Mono Mac 6 und THP-1 konnte eine differentielle Desensibilisierung durch eine Vorstimulation mit LPS induziert werden. Das Desensibilisierungsmuster der untersuchten Zelllinien war völlig unterschiedlich. Auch die Vorstimulation der Mono Mac 6 Zellen und der THP-1 Zellen mit IL-10 führte zu keinem vergleichbaren Ergebnis.

In Mono Mac 6 Zellen bewirkte die Vorstimulation mit LPS eine generelle Suppression der Chemokin- und Zytokinfreisetzung, also auch für die Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1, die in primären Monozyten keine Desensibilisierung zeigten (Abbildung 22). Im Fall einer IL-10-Vorbehandlung kam es dagegen zu keiner Suppression der Proteinfreisetzung (Abbildung 23). Die Vorinkubation mit

Zellen. Im Gegensatz zu der durch IL-10 induzierten Toleranz in primären Monozyten kam es hier also zu einer uneingeschränkten Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 sowie der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES.

Die untersuchten THP-1 Zellen zeigten im Gegensatz dazu ein vollkommen anderes Verhalten. Nach einer LPS-Vorbehandlung führte die Restimulation der Zellen zu keiner Suppression der untersuchten Chemokine und Zytokine (Abbildung 24). Eine Vorstimulation der THP-1 Zellen mit IL-10 bewirkte im Gegensatz dazu eine dosisabhängige Induktion der Freisetzung aller untersuchter Chemokine (Abbildung 25).

Diese Beobachtungen stehen im klaren Widerspruch zu der differentiellen Desensibilisierung in primären Monozyten. Die untersuchten Zelllinien Mono Mac 6 und THP-1 eignen sich daher nicht als Ersatz für primäre Monozyten als Modell der Toleranzinduktion durch LPS oder IL-10. Welche molekularen Mechanismen für die beobachteten Unterschiede zwischen den primären Monozyten und den Zelllinien Mono Mac 6 und THP-1 führen, muß noch näher analysiert werden. Aber auch hier sollte es möglich sein, durch Einsatz molekularbiologischer Arbeitsmethoden entscheidende Transkriptionsfaktoren oder Signalproteine zu isolieren und in ihrer Funktionsweise zu charakterisieren.

4. Die Suppression der Freisetzung der CXC-Chemokine in Influenza A/PR/8 infizierten Monozyten wird durch das membranassoziierte HA-Molekül vermittelt

Bei viralen Abwehrreaktionen spielen mononukleare Zellen eine entscheidende Rolle. Charakteristisch für virusinfiziertes Gewebe ist die Ausbildung eines spezifischen, von Monozyten und Lymphozyten dominierten Infiltrates. Neutrophile Granulozyten fehlen im virusinfiziertem Gewebe fast vollständig.

Wie vor kurzem gezeigt werden konnte, bildet die differentielle Expression von

beobachtete selektive Einwanderung von mononuklearen Zellen. Humane Monozyten antworten auf eine A/PR/8-Infektion mit einer starken Expression der Monozyten-spezifischen Chemokine MIP-1 α , MCP-1 und RANTES, wogegen die Neutrophilen-spezifischen Chemokine IL-8 und GRO- α vollständig supprimiert werden (Sprenger et al., 1996).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, chemotaktisch und aktivierend auf unterschiedliche Leukozytenpopulationen zu wirken, sind die Chemokine in der Lage, die beobachtete selektive Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe zu kontrollieren (Butcher, 1991; Schall et al., 1994; Webb et al., 1993; Baggiolini et al., 1994).

Influenza A Virus-infizierte Monozyten produzieren die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Nain et al., 1990; Gong et al., 1991; Bender et al., 1993; Sprenger et al., 1994). Deren Freisetzung kann jedoch für die Ausbildung dieses spezifischen Infiltrates nicht direkt verantwortlich sein, da sie auf Leukozyten nicht chemotaktisch wirken.

Die wichtige Rolle der CC-Chemokine bei viralen Abwehrreaktionen wird durch in vivo Beobachtungen an der MIP-1 α „knock out“ Maus verdeutlicht (Cook et al., 1995). Eine Influenza A-Infektion führte bei den defizienten Tieren zu einer deutlichen Reduktion des mononuklearen Zellinfiltrates im Respirationstrakt. Außerdem zeigten Coxsackievirus-infizierte Tiere keine Entzündungsreaktionen im Myokard. Weiterhin auffallend war die signifikant verminderte Fähigkeit der „knock out“ Tiere zur Viruselimination.

Eine Induktion von Chemokinen durch verschiedene Virusinfektionen wurde bereits gelegentlich beschrieben. So soll es z. B. nach einer Maserninfektion neben der Freisetzung von MCP-1 und MCP-2 auch zu einer IL-8-Produktion kommen (Van Damme et al., 1994; Choi et al., 1992). Weiterhin wurde gezeigt, daß die Infektion von Astrozyten und Mikrogliazellen mit NDV (Newcastle disease virus) eine Induktion des Monozyten-spezifischen Chemokins IP-10 bewirkt (Vanguri et al., 1994).

Für die widersprüchlichen Ergebnisse der IL-8-Freisetzung könnten verschiedene Faktoren verantwortlich sein. Da die Expression des IL-8-Gens in diesen Veröffentlichungen erst sehr spät im Verlauf der Infektion untersucht wurde, kann

oder TNF- α , nicht ausgeschlossen werden (Matsushima et al., 1989). Weiterhin kann die Expression des IL-8-Gens bereits durch minimale Stimuli induziert werden. So wirkt allein die Adhärenz der Zellen an Kunststoffoberflächen als ausreichender Stimulus für die IL-8-Induktion (Kasahara et al., 1991). Diese unspezifische Voraktivierung durch die Adhärenz der Zellen ist nach einer 24-stündigen Ruhephase nicht mehr nachweisbar (Kaufmann, 1995).

Um die für diese selektive Induktion von Monozyten-spezifischen Chemokinen verantwortlichen viralen Bestandteile zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit humane Monozyten mit nicht-infektiösen Virosomen stimuliert. Virosomen bestehen aus der zellulären Hüllmembran des A/PR/8-Virus und den darin eingelagerten viralen Molekülen HA (Hämagglutinin) und NA (Neuraminidase). Als weiteren viralen Bestandteil enthalten Virosomen das der Innenseite der Hüllmembran angelagerte M-Protein (Matrixprotein). Virosomen enthalten keine RNA-Moleküle und keine Nukleokapsidproteine. Sie eignen sich somit für die Untersuchung der Fragestellung, ob bereits das Binden der Hüllproteine an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche ausreichend ist, um die selektive Induktion der Chemokinfreisetzung in der Zelle zu induzieren, oder ob für diese Effekte die Infektiosität der Viruspartikel notwendig ist.

Im Dot-Blot konnte gezeigt werden, daß die präparierten Virosomen weniger als 1% der ursprünglichen Menge des Nukleoproteins enthielten (Abbildung 39). Bedenkt man, daß die meisten Viruspartikel (90-99%) ohnehin defective interfering particles (DI) sind (von Magnus et al., 1951), ist die Menge der noch in den Virosomen enthaltenen infektiösen Viren noch ungefähr um den Faktor 10-100 kleiner anzusehen. Dieser Anteil ist so gering, daß von keinem signifikanten Einfluß infektiöser Viren mehr ausgegangen werden muß. Diese Annahme wurde durch die Untersuchungen im Plaque-Test bestätigt: Die Virosomen waren nicht in der Lage, in den als Zielzellen eingesetzten MDCK II Zellen aktiv zu replizieren.

Die Virosomen bewirkten, genau wie die infektiösen Influenza A-Viren, eine deutliche Suppression der LPS-induzierten Freisetzung der CXCL-Chemokine IL-8 und CXCL (Abbildung 40). Die freigesetzte Menge wurde durch die Virosomen

zwar weniger stark vermindert als durch A/PR/8, war aber immer noch signifikant niedriger als die durch LPS allein induzierte Freisetzung. Die Suppression der CXC-Chemokinfreisetzung ist also unabhängig von der Infektiosität der Viruspartikel und kann bereits durch die Interaktion der Hüllproteine mit den zellulären Rezeptoren induziert werden. Im Gegensatz dazu war die Freisetzung des CC-Chemokins MCP-1 von der Infektion der Zellen mit intakten Viruspartikeln abhängig (Abbildung 41). Die eingesetzten Virosomen waren nicht in der Lage, die Freisetzung dieses Chemokins aus den Monozyten zu stimulieren. Ebenso wie für MCP-1 hatten die Virosomen keinen Einfluß auf die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 (Abbildung 42). Auch hierfür war die Stimulation der Monozyten mit infektiösen Viruspartikeln notwendig.

Es ist bekannt, daß Influenza A-Viren an bestimmte Sialylsäure-haltige Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen binden können, wodurch intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt werden. Zu diesen Rezeptoren gehören z. B. CD 43 (Sialophorin), CD 45 und sLe^x (Hartshorn et al., 1995). Das Virus bindet an diese Rezeptoren über das Hämagglutinin-Molekül (Hartshorn et al., 1995). Die Neuraminidase fungiert offensichtlich nicht als Bindungsmolekül (Abramson et al., 1985).

Durch den Einsatz von Antikörpern wurde die Bindung des HA-Moleküls an seine zellulären Rezeptoren blockiert. Dadurch konnte die Virus- oder Virosomen-induzierte Suppression der Freisetzung von IL-8 nach einer LPS-Stimulation verhindert werden (Abbildung 43). Hieraus ist zu schließen, daß die beobachtete Suppression der IL-8-Freisetzung bereits durch die Bindung des HA an die zellulären Rezeptoren induzierbar ist.

Beim Vergleich der suppressiven Effekte von Virosomen mit der Wirkung von löslichen HA-Molekülen zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede. Die löslichen HA-Moleküle waren im Gegensatz zur membranständigen Form nicht in der Lage, die LPS-induzierte IL-8-Freisetzung zu supprimieren (Abbildung 44). Die beobachtete Suppression der IL-8-Freisetzung war also auf das

membranassoziierte Hämagglutininmolekül als verantwortliches Schlüsselmolekül zurückzuführen.

Durch den Einsatz der Virosomen konnte nachgewiesen werden, daß die durch die Infektion der Monozyten mit A/PR/8 Viren induzierte Suppression der CXC-Chemokinfreisetzung durch die Bindung des Hüllproteins Hämagglutinin an die zellulären Rezeptoren ausgelöst werden kann. Das HA-Molekül muß hierfür in seiner membranständigen, dreidimensionalen Form vorliegen. Im Gegensatz dazu ist für die Induktion der MCP-1-Freisetzung, sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, eine Infektion mit aktiven Viren notwendig. Die Bindung der Hüllproteine an die Rezeptoren ist hierfür nicht ausreichend.

5. Chemokinrezeptorexpression

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist mit einer Veränderung des chemotaktischen Verhaltens verbunden

Die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen bewirkte ein verändertes chemotaktisches Verhalten: Während frische Monozyten auf MCP-1 mit einer stark ausgeprägten Chemotaxis antworteten, war die Anzahl der Zellen, die durch MIP-1 α chemotaktisch angelockt wurde, deutlich reduziert. Im Verlauf der weiteren Differenzierung konnte eine Umkehrung dieser Verhältnisse beobachtet werden. Die Zellen wurden jetzt vor allem durch MIP-1 α chemotaktisch angelockt, während die Migrationsfähigkeit auf MCP-1 deutlich verringert war (Abbildung 48). Die Annahme lag nahe, daß die Modifikationen im chemotaktischen Verhalten der Zellen eventuell auf Veränderungen der Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CCR 1 und CCR 5 bzw. CCR 2 zurückzuführen waren. Für die Rezeptoren CCR 1 und CCR 5 konnte die hochaffine Bindung von MIP-1 α nachgewiesen werden (Gao et al., 1993; Samson et al., 1996), während der CCR 2

Die Vermutung wird durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Zum einen konnte gezeigt werden, daß die PMA-induzierte Differenzierung von THP-1 Zellen, neben der reduzierten Migrationsfähigkeit auf MCP-1, zu einer Verringerung der Expression des Chemokinrezeptors CCR 2 führte (Denholm et al., 1995). Zum anderen konnte durch Northern Blot-Analysen eine Expression des CCR 2 nur in Monozyten-ähnlichen Zelllinien nachgewiesen werden, während die Expression des CCR 1 Rezeptors auf Makrophagen-ähnliche Zelllinien beschränkt war (Boring et al., 1995).

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellte differentielle Veränderung der Chemokinrezeptorexpression ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden. Die genauen molekularen Mechanismen, die für diese Veränderungen verantwortlich sind, müssen noch näher untersucht werden.

*Die Inkubation mit Chemokinen bewirkt **keine** Desensibilisierung für einen nachfolgenden chemotaktischen Stimulus*

Um Untersuchungen über ein verändertes chemotaktisches Verhalten nach Stimulation der Monozyten mit LPS oder Influenza A/PR/8 durchführen zu können, mußte zunächst der Einfluß der sekundär induzierten Chemokine auf das Migrationsverhalten der Zellen analysiert werden. Hierzu wurden die Zellen über einen Zeitraum von bis zu 2 Tagen mit verschiedenen Chemokinen vorinkubiert und im Anschluß das chemotaktische Verhalten im funktionellen Mikrochemotaxisassay untersucht.

Die Stimulation der Monozyten mit den verschiedenen Chemokinen führte zu keiner Veränderung der Migrationsfähigkeit auf einen nachfolgenden Stimulus (Abbildung 49). Es konnte sowohl nach homologer als auch nach heterologer Stimulation keine Desensibilisierung festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu verschiedenen Veröffentlichungen in der Literatur, die von einer Desensibilisierung des chemotaktischen Verhaltens und des Ca^{2+} -Einstroms nach der Vorinkubation mit Chemokinen berichten (Forssmann et al., 1997; Wang et al., 1993; Taub und Oppenheim, 1992). Allerdings erfolgte bei

erste Chemokingabe. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde der Chemokin-haltige Überstand nach der Inkubationszeit entfernt und die Zellen in frischem, Chemokin-freiem Medium aufgenommen. Die anschließend untersuchte Migrationsfähigkeit der so behandelten Monozyten war im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen unverändert, d. h. die Stimulation der Monozyten mit Chemokinen führte zu keiner funktionellen Veränderung der Chemokinrezeptorexpression. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß es im Anschluß an eine Chemokinexposition zu einer raschen Regenerierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche kommt und somit die Ansprechbarkeit der Zellen für einen weiteren Chemokinstimulus erhalten bleibt.

Die Stimulation von humanen Monozyten mit LPS bewirkt eine transiente, differentielle Desensibilisierung der Chemotaxis

Bei der Stimulation der Monozyten mit LPS zeigte sich eine transiente, differentielle Desensibilisierung des chemotaktischen Verhaltens: Unter LPS-Stimulation kam es anfänglich zu einer Verschlechterung der Wanderung der Zellen auf die chemotaktischen Stimuli fMLP und MIP-1 α . Im weiteren Verlauf der LPS-Stimulation kam es jedoch zu einer vollständigen Regeneration der Migrationsfähigkeit auf den Stimulus fMLP. Die Zellwanderung auf MIP-1 α konnte sich nicht vollständig erholen. Dem gegenüber stand eine unveränderte Migrationsfähigkeit der LPS-behandelten Zellen auf den Stimulus MCP-1 (Abbildung 50).

Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine Inhibition der in vitro Differenzierung durch LPS zurückzuführen. Diese Annahme wird durch Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe unterstützt (Brugger et al., 1991). Sie fanden neben der Induktion der funktionellen Aktivierung auch eine verzögerte Ontogenese der Monozyten nach LPS-Stimulation.

Untersuchungen zur Chemokinrezeptorexpression nach Stimulation mit LPS wurden bisher nur von Sica et al. (1997) beschrieben. Sie fanden eine generelle Suppression der mRNA-Expression für die Rezeptoren CCR 1, CCR 2 und CCR 5

Bindungsstudien mit markiertem MCP-1 sowie durch Chemotaxisdaten eine Abnahme der Rezeptorexpressionsdichte auf der Zelloberfläche vermutet.

Die unterschiedliche Migrationsfähigkeit von Monozyten und Makrophagen nach LPS-Stimulation läßt darauf schließen, daß es zu Beginn einer Entzündung zur präferentiellen Einwanderung frischer Monozyten kommt. Die Wanderungsfähigkeit dieser Zellen auf MCP-1 wird durch LPS nicht beeinflusst. Hierdurch wird die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion durch die verstärkte Freisetzung von Chemokinen und immunmodulatorischen Zytokinen durch diese Zellpopulation gewährleistet. Erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entzündung kommt es zur Einwanderung von Makrophagen, die besonders durch MIP-1 α chemotaktisch angelockt werden. Deren Aufgabengebiet umfaßt vor allem die Phagozytose der eingedrungenen Erreger und der geschädigten Gewebszellen, sowie die negative Regulation der Immunantwort.

Die Infektion von Monozyten mit Influenza A/PR/8 führt zu einer reduzierten Migrationsfähigkeit bei gleichzeitiger verstärkter Expression der Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Auswirkungen einer Influenza A/PR/8-Infektion auf die Chemokinrezeptorexpression sowie das chemotaktische Verhalten der infizierten Monozyten sind bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Die Inkubation der Monozyten mit Influenza A/PR/8 bewirkte bereits in einer sehr frühen Phase der Infektion eine drastische Reduktion der Migrationsfähigkeit der Zellen auf die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α . Dieser Effekt war nicht auf eine generelle Einschränkung des Wanderungsverhaltens zurückzuführen, weil die infizierten Zellen auf den Stimulus fMLP mit einer unveränderten chemotaktischen Aktivität reagierten (Abbildung 51).

Im Widerspruch zur verschlechterten Migrationsfähigkeit kam es in den infizierten

Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5 (Abbildung 52). Die beobachtete Veränderung des Wanderungsverhaltens virusinfizierter Monozyten war also nicht durch die Verringerung der Chemokinrezeptordichte bedingt. Vielmehr ist zu vermuten, daß durch die Virus-Infektion intrazelluläre Signaltransduktionswege beeinflusst werden und damit die chemotaktische Aktivierung der Zellen verhindert wird. Um die fehlenden Signale zu kompensieren, könnte ein Rückkopplungsmechanismus aktiviert werden, der zu einer verstärkten Expression der Rezeptoren führt. Welche molekularen Mechanismen für die verstärkte Expression verantwortlich sind, muß in weiterführenden Versuchen analysiert werden. Hierbei könnte sowohl die Induktion als auch eine Erhöhung der Halbwertszeit der mRNA für die Chemokinrezeptoren eine Rolle spielen. Eine Beteiligung beider Mechanismen konnte bereits nach LPS-Stimulation Influenza A-infizierter PU5-1.8 Makrophagen für die Freisetzung von TNF- α gezeigt werden (Gong et al., 1991).

Die Interaktion der Zellen mit inaktivierten Viren hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Migrationsverhalten oder auf die Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Abbildungen 51 und 52). Dazu war die Infektion der Zellen mit replikationsfähigem Virus obligat. Da aktive und inaktivierte Viren ähnliche Expressionsmuster in Monozyten induzieren, scheinen sekundär durch die Virus-Infektion freigesetzte Chemokine und/oder Zytokine bei den beschriebenen Vorgängen keine Rolle zu spielen.

V. Zusammenfassung

Mononukleäre Phagozyten spielen eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Infektionserregern. Durch die Freisetzung immunmodulatorischer Moleküle und chemotaktisch wirkender Zytokine (Chemokine) regulieren sie die Einwanderung immunkompetenter Zellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die durch bakterielle oder virale Infektionen induzierte Chemokin- und Zytokinexpression in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Monozyten untersucht. Die fortschreitende Differenzierung der Zellen führte für die meisten der analysierten Chemokine (IL-8, GRO- α , MCP-1, MCP-3, MIP-1 α und MIP-1 β) und Zytokine (TNF- α , IL-1 β und IL-6) zu einer deutlich reduzierten Induktion durch die Stimuli LPS oder Influenza A/PR/8. In den vollständig ausdifferenzierten Makrophagen wurde im Gegensatz dazu das CC-Chemokin RANTES und das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 am stärksten induziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es im Verlauf einer Entzündungsreaktion zu einer veränderten funktionellen Aktivität der Monozyten/Makrophagen kommt.

Ergänzend wurde die Induktion von Chemokinen und Zytokinen aus humanen Monozyten nach Stimulation mit den bakteriellen Modulinen MALP-2 (Makrophagen-aktivierendes Protein-2) und OspA (outer surface protein A) nachgewiesen. Aus Mykoplasmen isoliertes MALP-2, ebenso wie das aus Borrelien aufgereinigte OspA, scheinen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems zu spielen.

Die Veränderungen der Chemokin- und Zytokinfreisetzung nach einer Restimulation der Zellen mit verschiedenen bakteriellen Modulinen wurde analysiert. Die Vorbehandlung humaner Monozyten mit LPS führte zu einer differentiellen Desensibilisierung der Chemokin- und Zytokinfreisetzung. Wurden die Zellen mit einer zweiten LPS-Dosis restimuliert, waren alle Zytokine und Chemokine mit Ausnahme von IL-8, GRO- α und MCP-1 supprimiert. Als einer der

wesentlichen Mediatoren dieser differentiellen Desensibilisierung konnte das antiinflammatorische wirkende Zytokin IL-10 identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu kam es bei der Restimulation der Monozyten mit MALP-2 oder OspA zu einer Suppression der Chemokin- und Zytokinfreisetzung, die auch die Chemokine IL-8, GRO- α und MCP-1 betraf. Für die dauerhafte Persistenz von Mykoplasmen und Borrelien kann möglicherweise diese generelle Desensibilisierung der Chemokinfreisetzung verantwortlich sein.

Das histologische Bild einer Influenza A Virus-Infektion ist durch die massive Einwanderung von mononukleären Zellen geprägt. Für diesen Mechanismus ist die selektive Induktion von Chemokinen verantwortlich, die mononukleare Zellen rekrutieren. Neutrophilen-spezifische Chemokine werden durch eine A/PR/8-Infektion nicht induziert.

Durch den Einsatz von Virosomen und Antikörpern gegen die Proteine HA und NA konnte das membranassoziierte Hämagglutinin als verantwortliches Schlüsselmolekül für die Suppression der CXC-Chemokinfreisetzung identifiziert werden. Im Gegensatz dazu war für die Freisetzung der CC-Chemokine und der Zytokine TNF- α und IL-6 die uneingeschränkte Infektiosität der Viruspartikel notwendig.

Die Differenzierung der Monozyten ist bereits mit einer Veränderung des chemotaktischen Verhaltens verbunden. Frische Monozyten wurden besonders durch MCP-1, Makrophagen vor allem durch MIP-1 α chemotaktisch angelockt. Diese funktionelle Veränderung der Zellen konnte auf eine vom Differenzierungsgrad abhängige Expression der Rezeptoren CCR 1 und CCR 5 bzw. CCR 2 zurückgeführt werden.

Durch die Stimulation humaner Monozyten mit LPS konnte eine transiente, differentielle Desensibilisierung der Migrationsfähigkeit induziert werden. Einer kurzzeitigen Reduktion der Zellwanderung auf die Stimuli fMLP und MIP-1 α stand eine unveränderte Migrationsfähigkeit auf MCP-1 gegenüber.

Nach Infektion von Monozyten mit A/PR/8 wanderten die Zellen nicht mehr auf die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α , während die infizierten Zellen auf fMLP mit einer

infizierten Zellen aber eine deutliche Zunahme der Expression der Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5 festzustellen. Das reduzierte Wanderungsverhalten der Zellen war also nicht durch eine Verringerung der Rezeptordichte bedingt.

VI. Literaturverzeichnis

Abbas, A., Lichtman, A., & Pober, J. (1994). Cellular and Molecular Immunology. 2. Auflage. WB Saunders Company, Philadelphia.

Abramson, J.S., & Wheeler J. (1993). The Neutrophil. 1st edition. Oxford University Press, Oxford.

Abramson, J.S., & Hudnor, H.R. (1995). Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus- induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood*, 85, 1615-1619.

Aderka, D., Holtmann, H., Toker, L., Hahn, T., & Wallach, D. (1986). Tumor necrosis factor induction by Sendai virus. *J Immunol*, 136, 2938-2942.

Altstaedt, J., Kirchner, H., & Rink, L. (1996). Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology*, 89, 563-568.

Antoniades, H.N., Neville-Golden, J., Galanopoulos, T., Kradin, R.L., Valente, A.J., & Graves, D.T. (1992). Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5371-5375.

Asakura, E., Hanamura, T., Umemura, A., Yada, K., Yamauchi, T., & Tanabe, T. (1996). Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on lipopolysaccharide (LPS)-induced mediator production from monocytes in vitro. *Immunobiology*, 195, 300-313.

Baggiolini, M., Dewald, B., & Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*, 55:97-179, 97-179.

Baggiolini, M., Dewald, B., & Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*, 15:675-705, 675-705.

Barile, M.F., Yoshida, H., & Roth, H. (1991). Rheumatoid arthritis: new findings on the failure to isolate or detect mycoplasmas by multiple cultivation or serologic procedures and a review of the literature. *Rev Infect Dis*, 13, 571-582.

Barrett, T., & Inglis, S.C. (1985). Growth purification and titration of influenza viruses. In „Virology: A practical approach“ (B.W.J. Maty, ed) pp. 119-150. Oxford IRL Press 1993.

Bartocci, A., Mastrogiannis, D.S., Migliorati, G., Stockert, R.J., Wolkoff, A.W., & Stanley, E.R. (1987). Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6179-6183.

Bauer, J., Ganter, U., Geiger, T., Jacobshagen, U., Hirano, T., Matsuda, T., Kishimoto, T., Andus, T., Acs, G., & Gerok, W. (1988). Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Blood*, 72, 1134-1140.

Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., & Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385, 640-644.

Bazzoni, F., Cassatella, M.A., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B., & Baggiolini, M. (1991). Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med*, 173, 771-774.

Beckman, Instruction Manual (1981). The JE-6B elutriation system and roter published by Spinco Division of Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California 94394.

Bender, A. (1992). Freisetzung von Mediatoren aus Influenza A Virus-infizierten Makrophagen: Wirkungsvergleich von bakteriellen Lipopolysacchariden mit bakteriellen Lipopeptiden. Doktorarbeit

Bender, A., Amann, U., Jager, R., Nain, M., & Gerns, D. (1993). Effect of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on human monocytes infected with influenza A virus. Enhancement of virus replication, cytokine release, and cytotoxicity. *J Immunol*, 151, 5416-5424.

Bhakdi, S., Klonisch, T., Nuber, P., & Fischer, W. (1991). Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun*, 59, 4614-4620.

Bodkin, D.K., & Knudson, D.L. (1985). Assessment of sequence relatedness of double-stranded RNA genes by RNA- RNA blot hybridization. *J Virol Methods*, 10, 45-52.

Boring, L., Gosling, J., Montecarlo, F.S., Lolis, A.J., Tsou, C.L., & Charo, I.F. (1996). Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein 1alpha receptors: evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9. *J Biol Chem*, 271, 7551-7558.

Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97:77-89, 77-89.

Brandt, E., Petersen, F., & Flad, H.D. (1992). Recombinant tumor necrosis factor-alpha potentiates neutrophil degranulation in response to host defense cytokines neutrophil-activating peptide 2 and IL-8 by modulating intracellular cyclic AMP levels. *J Immunol*, 149, 1356-1364.

Brugger, W., Reinhardt, D., Galanos, C., & Andreessen, R. (1991). Inhibition of in vitro differentiation of human monocytes to macrophages by lipopolysaccharides (LPS): phenotypic and functional analysis. *Int Immunol*, 3, 221-227.

Bundschuh, D.S., Barsig, J., Hartung, T., Randow, F., Docke, W.D., Volk, H.D., & Wendel, A. (1997). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide- desensitized mice. *J Immunol*, 158, 2862-2871.

Burchett, S.K., Weaver, W.M., Westall, J.A., Larsen, A., Kronheim, S., & Wilson, C.B. (1988). Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J Immunol*, 140, 3473-3481.

Butcher, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67, 1033-1036.

Cannistra, S.A., Vellenga, E., Groshek, P., Rambaldi, A., & Griffin, J.D. (1988). Human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and interleukin 3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumor necrosis factor- dependent mechanism. *Blood*, 71, 672-676.

Carre, P.C., Mortenson, R.L., King, T.E., Jr., Noble, P.W., Sable, C.L., & Riches, D.W. (1991). Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest*, 88, 1802-1810.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3666-3670.

Cavaillon, J.M., Fitting, C., & Haeffner-Cavaillon, N. (1990). Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *Eur J Immunol*, 20, 253-257.

Cavaillon, J.M., & Haeffner-Cavaillon, N. (1990). Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. *Cytokine*, 2, 313-329.

Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J., & Coughlin, S.R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2752-2756.

Choi, A.M., & Jacoby, D.B. (1992). Influenza virus A infection induces interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *FEBS Lett*, 309, 327-329.

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162,

Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., & Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells [see comments]. *Science*, 270, 1811-1815.

Cole, B.C., Washburn, L.R., & Tayler-Robinson, D. (1985). Mycoplasma-induced arthritis. In „The Mycoplasma“. Razin, S., & Barile, M.F. (editors). Academic Press, Orlando.

Colotta, F., Borre, A., Wang, J.M., Tattanelli, M., Maddalena, F., Polentarutti, N., Peri, G., & Mantovani, A. (1992). Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol*, 148, 760-765.

Cook, D.N., Beck, M.A., Coffman, T.M., Kirby, S.L., Sheridan, J.F., Pragnell, I.B., & Smithies, O. (1995). Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science*, 269, 1583-1585.

Danforth, J.M., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., VanOtteren, G.M., & Standiford, T.J. (1995). Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in vivo and in vitro: the role of lipoteichoic acid. *Clin Immunol Immunopathol*, 74, 77-83.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R., & Landau, N.R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature*, 381, 661-666.

Denholm, E.M., & Stankus, G.P. (1995). Changes in the expression of MCP-1 receptors on monocytic THP-1 cells following differentiation to macrophages with phorbol myristate acetate. *Cytokine*, 7, 436-440.

Deuel, T.F., Keim, P.S., Farmer, M., & Heinrikson, R.L. (1977). Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 2256-2258.

Dijkstra, J., Bron, R., Wilschut, J., de Haan, A., & Ryan, J.L. (1996). Activation of murine lymphocytes by lipopolysaccharide incorporated in fusogenic, reconstituted influenza virus envelopes (viroosomes). *J Immunol*, 157, 1028-1036.

Docke, W.D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Volk, H.D., & Kox, W. (1997). Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*, 3, 678-681.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., & Paxton, W.A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5 [see comments]. *Nature*, 381, 667-673.

Dubitsky, A., Brown, J., & Brandwein, H. (1992). Chemiluminescent detection of DNA on nylon membranes. *Biotechniques*, 13, 392-400.

Ebnet, K., Brown, K.D., Siebenlist, U.K., Simon, M.M., & Shaw, S. (1997). *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-kappa B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J Immunol*, 158, 3285-3292.

Erroi, A., Fantuzzi, G., Mengozzi, M., Sironi, M., Orencole, S.F., Clark, B.D., Dinarello, C.A., Isetta, A., Gnocchi, P., & Giovarelli, M. (1993). Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infect Immun*, 61, 4356-4359.

Fahmi, H., Ancuta, P., Perrier, S., & Chaby, R. (1996). Preexposure of mouse peritoneal macrophages to lipopolysaccharide and other stimuli enhances the nitric oxide response to secondary stimuli. *Inflamm Res*, 45, 347-353.

Fahmi, H., & Chaby, R. (1993). Desensitization of macrophages to endotoxin effects is not correlated with a down-regulation of lipopolysaccharide-binding sites. *Cell Immunol*, 150, 219-229.

Falk, W., Goodwin, R.H., Jr., & Leonard, E.J. (1980). A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Methods*, 33, 239-247.

Farber, J.M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 61, 246-257.

Feist, W., Ulmer, A.J., Musehold, J., Brade, H., Kusumoto, S., & Flad, H.D. (1989). Induction of tumor necrosis factor-alpha release by lipopolysaccharide and defined lipopolysaccharide partial structures. *Immunobiology*, 179, 293-307.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., & Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science*, 272, 872-877.

Fields, B.N., & Knipe, D.M. (Hrsg.) (1991). *Fundamental Virology*. 2nd edition. Raven Press, New York.

Forssmann, U., Uguccioni, M., Loetscher, P., Dahinden, C.A., Langen, H., Thelen, M., & Baggiolini, M. (1997). Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med*, 185, 2171-2176.

Foster, S.J., Aked, D.M., Schroder, J.M., & Christophers, E. (1989). Acute inflammatory effects of a monocyte-derived neutrophil-activating peptide in rabbit skin. *Immunology*, 67, 181-183.

Figdor, C.G., Leemans, J.M.M., Bont, W.S., & DeVries, J.E. (1983). Theory and practice of centrifugal elutriation (CE). *Cell Biophyscs*. 5: 105-118.

Frisch, M., Gradehandt, G., & Muhlradt, P.F. (1996). Mycoplasma fermentans-derived lipid inhibits class II major histocompatibility complex expression without mediation by interleukin- 6, interleukin-10, tumor necrosis factor, transforming growth factor- beta, type I interferon, prostaglandins or nitric oxide. *Eur J Immunol*, 26, 1050-1057.

Fuller, S., von Bonsdorff, C.H., & Simons, K. (1984). Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell*, 38, 65-77.

Gantner, F., Kupferschmidt, R., Schudt, C., Wendel, A., & Hatzelmann, A. (1997). In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-alpha release by PDE inhibitors. *Br J Pharmacol*, 121, 221-231.

Gao, J.L., Kuhns, D.B., Tiffany, H.L., McDermott, D., Li, X., Francke, U., & Murphy, P.M. (1993). Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J Exp Med*, 177, 1421-1427.

Gardner, I.D., & Lawton, J.W. (1982). Depressed human monocyte function after influenza infection in vitro. *J Reticuloendothel Soc*, 32, 443-448.

Garn, H., Krause, H., Enzmann, V., & Drossler, K. (1994). An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. *J Immunol Methods*, 168, 253-256.

Gemsa, D., Kalten, J.R., & Resch, K. (Hrsg.) (1997). Immunologie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Gemsa, D., & Kozan, B. (1984). Entzündungszellen. *Allergologie* 7: 183-184.

Gessani, S., Testa, U., Varano, B., Di Marzio, P., Borghi, P., Conti, L., Barberi, T., Tritarelli, E., Martucci, R., & Seripa, D. (1993). Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *J Immunol*, 151, 3758-3766.

Goldberg, D.A. (1980). Isolation and partial characterization of the Drosophila alcohol dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 5794-5798.

Goldfeld, A.E., Doyle, C., & Maniatis, T. (1990). Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9769-9773.

Goldfeld, A.E., & Maniatis, T. (1989). Coordinate viral induction of tumor necrosis factor alpha and interferon beta in human B cells and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 1490-1494.

Goldfeld, A.E., Strominger, J.L., & Doyle, C. (1991). Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. *J Exp Med*, 174, 73-81.

Gong, J.H., Sprenger, H., Hinder, F., Bender, A., Schmidt, A., Horch, S., Nain, M., & Gemsa, D. (1991). Influenza A virus infection of macrophages. Enhanced tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression and lipopolysaccharide-triggered TNF-alpha release. *J Immunol*, 147, 3507-3513.

Gortz, J., Brake, B., Harle-Grupp, V., & Falke, D. (1984). Replication of HSV-1 in murine peritoneal macrophages: comparison of various virus strains with different properties. *Arch Virol*, 79, 173-187.

Goto, M., Yoshioka, T., Young, R.I., Battelino, T., Anderson, C.L., & Zeller, W.P. (1997). A sublethal dose of LPS to pregnant rats induces TNF-alpha tolerance in their 0-day-old offspring. *Am J Physiol*, 273, R1158-62.

Grant, W.D., & Morrison, M. (1979). Resolution of cells by centrifugal elutriation. *Anal Biochem*, 98, 112-115.

Griffin, G.E., Leung, K., Folks, T.M., Kunkel, S., & Nabel, G.J. (1989). Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B [see comments]. *Nature*, 339, 70-73.

Gronenborn, A.M., & Clore, G.M. (1991). Modeling the three-dimensional structure of the monocyte chemoattractant and activating protein MCAF/MCP-1 on the basis of the solution structure of interleukin-8. *Protein Eng.* 4: 263-269.

Haas, J.G., Meyer, N., Riethmuller, G., & Ziegler-Heitbrock, H.W. (1990). Inhibition of lipopolysaccharide-induced in vitro desensitization by interferon-gamma. *Eur J Immunol*, 20, 1181-1184.

Hahn, H., Falke, D., & Klein, P. (1991). *Medizinische Mikrobiologie*. 1. Auflage. Springer Verlag. ISBN 3-540-19389-8.

Hamilton, T.A., & Adams, D.O. (1987). Molecular mechanism of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today* 8: 151-158.

Haq, A.U., & Maca, R.D. (1986). Role of IFN-gamma and alpha in IL 1 synthesis and secretion of in vitro differentiated human macrophages: a comparative study. *Immunobiology*, 171, 451-460.

Hartshorn, K.L., Liou, L.S., White, M.R., Kazhdan, M.M., Tauber, J.L., & Tauber, A.I. (1995). Neutrophil deactivation by influenza A virus. Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins. *J Immunol*, 154, 3952-3960.

Haskill, S., Peace, A., Morris, J., Sporn, S.A., Anisowicz, A., Lee, S.W., Smith, T., Martin, G., Ralph, P., & Sager, R. (1990). Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7732-7736.

Henderson, B., Poole, S., & Wilson, M. (1996). Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev*, 60, 316-341.

Henricson, B.E., Manthey, C.L., Perera, P.Y., Hamilton, T.A., & Vogel, S.N. (1993). Dissociation of lipopolysaccharide (LPS)-inducible gene expression in murine macrophages pretreated with smooth LPS versus monophosphoryl lipid A. *Infect Immun*, 61, 2325-2333.

Herrman, E.C., Gabilitis, J., Engle, C., & Perlman, P.C. (1960). Agar diffusion method for detection and bioassay for antiviral antibiotics. *Proc. soc. Exp. Biol. Med.* 1038: 625-628.

Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M.P., & Tomasz, A. (1994). Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun*, 62, 2715-2721.

Hitchcock, P.J., Leive, L., Makela, P.H., Rietschel, E.T., Strittmatter, W., & Morrison, D.C. (1986). Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol*, 166, 699-705.

Holtke, H.J., Sagner, G., Kessler, C., & Schmitz, G. (1992). Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its applications. *Biotechniques*, 12, 104-113.

Horner, P.J., Gilroy, C.B., Thomas, B.J., Naidoo, R.O., & Taylor-Robinson, D. (1993). Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet*, 342, 582-585.

Howard, O.M., Ben-Baruch, A., & Oppenheim, J.J. (1996). Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol*, 14, 46-51.

Imhof, B.A., & Dunon, D. (1995). Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol*, 58:345-416, 345-416.

Jakab, G.J., Warr, G.A., & Sannes, P.L. (1980). Alveolar macrophage ingestion and phagosome-lysosome fusion defect associated with virus pneumonia. *Infect Immun*, 27, 960-968.

Jennings, S.T., Ettensohn, D.B., & Roberts, N.J., Jr. (1984). Influenza virus infection of human alveolar and peripheral blood-derived macrophages. Production of factors that alter fibroblast proliferation. *Am Rev Respir Dis*, 130, 98-102.

Jensen, J.S., Orsum, R., Dohn, B., Uldum, S., Worm, A.M., & Lind, K. (1993). Mycoplasma genitalium: a cause of male urethritis? *Genitourin Med*, 69, 265-269.

Jiang, Y., Beller, D.I., Frendl, G., & Graves, D.T. (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*, 148, 2423-2428.

Jose, P.J., Griffiths-Johnson, D.A., Collins, P.D., Walsh, D.T., Moqbel, R., Totty, N.F., Truong, O., Hsuan, J.J., & Williams, T.J. (1994). Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*, 179, 881-887.

Junqueira L.C., & Carneiro, J. (1986). Histologie. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin.

Kaplan, G., Luster, A.D., Hancock, G., & Cohn, Z.A. (1987). The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med*, 166, 1098-1108.

Kasahara, K., Strieter, R.M., Chensue, S.W., Standiford, T.J., & Kunkel, S.L. (1991). Mononuclear cell adherence induces neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*, 50, 287-295.

Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., & Kunkel, S.L. (1993). Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med*, 178, 63-72.

Kaufmann, A. (1995). Selektive Induktion chemotaktischer Zytokine (Chemokine) für Monozyten und Lymphozyten durch Influenza A Virus-Infektion. Diplomarbeit.

Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., & Schall, T.J. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 266, 1395-1399.

Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., & Strieter, R.M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis [see comments]. *Science*, 258, 1798-1801.

Kostyal, D.A., Butler, G.H., & Beezhold, D.H. (1994). A 48-kilodalton Mycoplasma fermentans membrane protein induces cytokine secretion by human monocytes. *Infect Immun*, 62, 3793-3800.

Lehrbach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., & Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinants by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 97-101.

Leung, K., & Nabel, G.J. (1988). HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF-kappa B-like factor. *Nature*, 333, 776-778.

Levy, D., Bluzat, A., Seigneuret, M., & Rigaud, J.L. (1990). A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochim Biophys Acta*, 1025, 179-190.

Lo, S.C., Hayes, M.M., Wang, R.Y., Pierce, P.F., Kotani, H., & Shih, J.W. (1991). Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. *Lancet*, 338, 1415-1418.

Magnus, P. von (1951). Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryo. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 28: 278-293.

Maione, T.E., Gray, G.S., Petro, J., Hunt, A.J., Donner, A.L., Bauer, S.I., Carson, H.F., & Sharpe, R.J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science*, 247, 77-79.

Mak, N.K., & Ada, G.L. (1984). The acquisition of anti-influenza virus activity by macrophages. *Immunobiology*, 166, 458-472.

Mannel, D.N., & Falk, W. (1989). Optimal induction of tumor necrosis factor production in human monocytes requires complete S-form lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 57, 1953-1958.

Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J., & Mattoli, S. (1992). Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage- colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 89, 1001-1009.

Matic, M., & Simon, S.R. (1992). Effects of gamma interferon on release of tumor necrosis factor alpha from lipopolysaccharide-tolerant human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*, 60, 3756-3762.

Matsushima, K., & Oppenheim, J.J. (1989). Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*, 1, 2-13.

Mattsson, E., Verhage, L., Rollof, J., Fleer, A., Verhoef, J., & van Dijk, H. (1993). Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 7, 281-287.

McChesney, M.B., & Oldstone, M.B. (1987). Viruses perturb lymphocyte functions: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression. *Annu Rev Immunol*, 5:279-304, 279-304.

McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., & Gehring, W.J. (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, 308, 428-433.

Mengozzi, M., Fantuzzi, G., Sironi, M., Bianchi, M., Fratelli, M., Peri, G., Bernasconi, S., & Ghezzi, P. (1993). Early down-regulation of TNF production by LPS tolerance in human monocytes: comparison with IL-1 beta, IL-6, and IL-8. *Lymphokine Cytokine Res*, 12, 231-236.

Miller, E.J., Cohen, A.B., Nagao, S., Griffith, D., Maunder, R.J., Martin, T.R., Weiner-Kronish, J.P., Sticherling, M., Christophers, E., & Matthay, M.A. (1992). Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis*, 146, 427-432.

Miller, M.D., Hata, S., De Waal Malefyt, R., & Krangel, M.S. (1989). A novel polypeptide secreted by activated human T lymphocytes. *J Immunol*, 143, 2907-2916.

Mills, J. (1979). Effects of Sendai virus infection on function of cultured mouse alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis*, 120, 1239-1244.

Mogenson, S.C. (1979). Role of macrophages in natural resistance to virus infections. *Micro. Biol. Rev.* 43: 1-26.

Morahan, P.S., Connor, J.R., & Leary, K.R. (1985). Viruses and the versatile macrophage. *Br Med Bull*, 41, 15-21.

Morahan, P.S., & Miller, G.A. (1984). Ectoenzymes in the expression of mononuclear phagocyte differentiation: Mini-review. In „Biology of mononuclear phagocytes“ (A.Vokkmann ed.) New York.

Morrison, T.B., Weis, J.H., & Weis, J.J. (1997). *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) activates and primes human neutrophils. *J Immunol*, 158, 4838-4845.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.

Muhlradt, P.F., Kiess, M., Meyer, H., Sussmuth, R., & Jung, G. (1997). Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med*, 185, 1951-1958.

Muhlradt, P.F., & Schade, U. (1991). MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infect Immun*, 59, 3969-3974.

Mukaida, N., Shiroo, M., & Matsushima, K. (1989). Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol*, 143, 1366-1371.

Nain, M., Hinder, F., Gong, J.H., Schmidt, A., Bender, A., Sprenger, H., & Gemsa, D. (1990). Tumor necrosis factor- α production of influenza A virus-infected macrophages and potentiating effect of lipopolysaccharides. *J Immunol*, 145, 1921-1928.

Nakamura, H., Yoshimura, K., McElvaney, N.G., & Crystal, R.G. (1992). Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest*, 89, 1478-1484.

Nathan, C.F. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*, 79, 319-326.

Neote, K., Mak, J.Y., Kolakowski, L.F., Jr., & Schall, T.J. (1994). Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood*, 84, 44-52.

Nugent, K.M., & Pesanti, E.L. (1979). Effect of influenza infection on the phagocytic and bactericidal activities of pulmonary macrophages. *Infect Immun*, 26, 651-657.

Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J.A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., Woolf, E., Alperin, G., Culpepper, J., Gutierrez-Ramos, J.C., & Gearing, D. (1997). Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation [published erratum appears in *Nature* 1997 Sep 4; 389(6646):100]. *Nature*, 387, 611-617.

Paul, I., & William, E. (Hrsg.) (1983). *Fundamental Immunology*. 3. Auflage. Raven Press, New York.

Pauligk, C. (1997). Induktion von Zytokinen und Chemokinen in neutrophilen Granulozyten durch bakterielles Lipopolysaccharid und Influenza A-Virus. Diplomarbeit.

Peters, A.M., Bertram, P., Gahr, M., & Speer, C.P. (1993). Reduced secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α by neonatal monocytes. *Biol Neonate*, 63, 157-162.

Philip, R., & Epstein, L.B. (1986). Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature*, 323, 86-89.

Quentmeier, H., Schmitt, E., Kirchhoff, H., Grote, W., & Muhlradt, P.F. (1990). Mycoplasma fermentans-derived high-molecular-weight material induces interleukin-6 release in cultures of murine macrophages and human monocytes. *Infect Immun*, 58, 1273-1280.

Radolf, J.D., Arndt, L.L., Akins, D.R., Curetty, L.L., Levi, M.E., Shen, Y., Davis, L.S., & Norgard, M.V. (1995). Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J Immunol*, 154, 2866-2877.

Rager-Zisman, B., Kunkel, M., Tanaka, Y., & Bloom, B.R. (1982). Role of macrophage oxidative metabolism in resistance to vesicular stomatitis virus infection. *Infect Immun*, 36, 1229-1237.

Rampart, M., Herman, A.G., Grillet, B., Opdenakker, G., & Van Damme, J. (1992). Development and application of a radioimmunoassay for interleukin-8: detection of interleukin-8 in synovial fluids from patients with inflammatory joint disease. *Lab Invest*, 66, 512-518.

Randow, F., Docke, W.D., Bundschuh, D.S., Hartung, T., Wendel, A., & Volk, H.D. (1997). In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-gamma, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*, 158, 2911-2918.

Randow, F., Syrbe, U., Meisel, C., Krausch, D., Zuckermann, H., Platzer, C., & Volk, H.D. (1995). Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 181, 1887-1892.

Rawadi, G., & Roman-Roman, S. (1996). Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 64, 637-643.

Richmond, A., Balentien, E., Thomas, H.G., Flaggs, G., Barton, D.E., Spiess, J., Bordoni, R., Francke, U., & Deryneck, R. (1988). Molekular charakterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity. A growth factor structurally related to β -thromboglobulin. *EMBO J*, 7: 2025-2033.

Richmond, A., & Thomas, H.G. (1988). Melanoma growth stimulatory activity. Isolation from human melanoma tumors and charakterization of tissue distribution. *J Cell Biochem*, 36: 185-198.

Riesenfeld-Orn, I., Wolpe, S., Garcia-Bustos, J.F., Hoffmann, M.K., & Tuomanen, E. (1989). Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect Immun*, 57, 1890-1893.

Rodgers, B., & Mims, C.A. (1981). Interaction of influenza virus with mouse macrophages. *Infect Immun*, 31, 751-757.

Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. (1987). Lehrbuch der Immunologie. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Rollins, B.J., Stier, P., Ernst, T., & Wong, G.G. (1989). The human homolog of the .IF gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol* 9 4687-4695

Rollins, B.J., Walz, A., & Baggiolini, M. (1991). Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*, 78, 1112-1116.

Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G., & Parmentier, M. (1996). Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry*, 35, 3362-3367.

Schaefferbeke, T., Gilroy, C.B., Bebear, C., Dehais, J., & Taylor-Robinson, D. (1996). Mycoplasma fermentans, but not M penetrans, detected by PCR assays in synovium from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders. *J Clin Pathol*, 49, 824-828.

Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., & Goeddel, D.V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, 347, 669-671.

Schall, T.J., & Bacon, K.B. (1994). Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol*, 6, 865-873.

Schall, T.J., Jongstra, J., Dyer, B.J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M.M., & Krensky, A.M. (1988). A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol*, 141, 1018-1025.

Scheibebogen, C., & Andreesen, R. (1991). Developmental regulation of the cytokine repertoire in human macrophages: IL-1, IL-6, TNF-alpha, and M-CSF. *J Leukoc Biol*, 50 (1), 35-42.

Schroder, J.M. (1992). Generation of NAP-1 and related peptides in psoriasis and other inflammatory skin diseases. *Cytokines*, 4:54-76, 54-76.

Schroder, J.M., Mrowietz, U., Morita, E., & Christophers, E. (1987). Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol*, 139, 3474-3483.

Schwarzmann, S.W., Adler, J.L., Sullivan, R.J., Jr., & Marine, W.M. (1971). Bacterial pneumonia during the Hong Kong influenza epidemic of 1968- 1969. *Arch Intern Med*, 127, 1037-1041.

Seed, B. (1992). Attachment of nucleic acids to nitrocellulose and diazoniumsubstituted supports. In: Genetic engineering: Principles and methods. Vol. 4. Setlow, J.K., & Hollaender, A. (editors). Plenum Publishing New York, Page 91.

Sherry, B., Horii, Y., Manogue, K.R., Widmer, U., & Cerami, A. (1992). Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: an overview. *Cytokines*, 4:117-30, 117-130.

Sica, A., Sacconi, A., Borsatti, A., Power, C.A., Wells, T.N., Luini, W., Polentarutti, N., Sozzani, S., & Mantovani, A. (1997). Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med*, 185, 969-974.

Smith, W., Andrews, C.H., & Laidlaw, P.P. (1933). A virus obtained from influenza patients. „The influenza viruses“. Virology Monogr. Hoyle, L., (editor). Springer Verlag, Wien , New York (1968).

Sprenger, H. (1989). Makrophagenaktivierung zur Tumorzytotoxizität: Inhibition der Nukleinsäuresynthese und zytotoxische Prinzipien der Tumor-Makrophagen-Linie PU 5-1.8 und Knochenmarksmakrophagen. Disserationsarbeit.

Sprenger, H., Bacher, M., Rischkowsky, E., Bender, A., Nain, M., & Gemsa, D. (1994). Characterization of a high molecular weight tumor necrosis factor- α mRNA in influenza A virus-infected macrophages. *J Immunol*, 152, 280-289.

Sprenger, H., Krause, A., Kaufmann, A., Priem, S., Fabian, D., Burmester, G.R., Gemsa, D., & Rittig, M.G. (1997). *Borrelia burgdorferi* induces chemokines in human monocytes. *Infect Immun*, 65, 4384-4388.

Sprenger, H., Meyer, R.G., Kaufmann, A., Bussfeld, D., Rischkowsky, E., & Gemsa, D. (1996). Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection. *J Exp Med*, 184, 1191-1196.

Standiford, T.J., Arenberg, D.A., Danforth, J.M., Kunkel, S.L., VanOtteren, G.M., & Strieter, R.M. (1994). Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infect Immun*, 62, 119-125.

Standiford, T.J., Strieter, R.M., Chensue, S.W., Westwick, J., Kasahara, K., & Kunkel, S.L. (1990). IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *J Immunol*, 145, 1435-1439.

Stohlman, S.A., Woodward, J.G., & Frelinger, J.A. (1982). Macrophage antiviral activity: extrinsic versus intrinsic activity. *Infect Immun*, 36, 672-677.

Stuart-Harris, C.A. (1961). Twenty years of influenza epidemics. *Am. Re. Respir. Dis.* 83: 54-67.

Taffet, S.M., & Russell, S.W. (1981). Macrophage-mediated tumor cell killing: regulation of expression of cytolytic activity by prostaglandin E. *J Immunol*, 126, 424-427.

Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., & Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β [see comments]. *Nature*, 361, 79-82.

Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., & Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 261, 600-603.

Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., & Kelvin, D.J. (1993). Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science*, 260, 355-358.

Taub, D.D., & Oppenheim, J.J. (1993). Review of the chemokine meeting the Third International Symposium of Chemotactic Cytokines. *Cytokine*, 5, 175-179.

Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 5201-5205.

Timmers, H.T., Pronk, G.J., Bos, J.L., & van der Eb, A.J. (1990). Analysis of the rat JE gene promoter identifies an AP-1 binding site essential for basal expression but not for TPA induction. *Nucleic Acids Res*, 18, 23-34.

Tobias, P.S., Soldau, K., & Ulevitch, R.J. (1986). Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med*, 164, 777-793.

Uguccioni, M., Loetscher, P., Forssmann, U., Dewald, B., Li, H., Lima, S.H., Li, Y., Kreider, B., Garotta, G., Thelen, M., & Baggiolini, M. (1996). Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J Exp Med*, 183, 2379-2384.

Ulevitch, R.J. (1993). Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv Immunol*, 53:267-89, 267-289.

Vaillancourt, R.E., Weeden, N.F., & Garvin, D.F. (1992). Increasing the efficiency and economy of the chemiluminescent detection of DNA. *Biotechniques*, 13, 339-340.

Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J.P., & Opdenakker, G. (1992). Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med*, 176, 59-65.

Van Damme, J., Proost, P., Put, W., Arens, S., Lenaerts, J.P., Conings, R., Opdenakker, G., Heremans, H., & Billiau, A. (1994). Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers. Chemical synthesis of MCP-2 and development of a specific RIA. *J Immunol*, 152, 5495-5502.

Van Damme, J., Rampart, M., Conings, R., Decock, B., Van Osselaer, N., Willems, J., & Billiau, A. (1990). The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH2-terminally processed forms. *Eur J Immunol*, 20, 2113-2118.

van Furth, R. (1982). Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology*, 161, 178-185.

Vanguri, P., & Farber, J.M. (1994). IFN and virus-inducible expression of an immediate early gene, *crg-2/IP-10*, and a delayed gene, *I-A alpha* in astrocytes and microglia. *J Immunol*, 152, 1411-1418.

Volkman, A., & Gewans, J.L. (1963). The origin of macrophage from human bone marrow in the rat. *J. Exp. Med.* 128: 514.

Wagner, R.R. (1961). Biological studies of interferon I. Suppression of cellular infection with eastern equine encephalomyelitis virus. *Virology* 13: 323-337.

Wahl, G.M., Berger, S.L., & Kimmel, A.R. (1987). Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods Enzymol*, 152:399-407, 399-407.

Wahl, G.M., Meinkoth, J.L., & Kimmel, A.R. (1987). Northern and Southern blots. *Methods Enzymol*, 152:572-81, 572-581.

Walker, C.M., Moody, D.J., Stites, D.P., & Levy, J.A. (1989). CD8+ T lymphocyte control of HIV replication in cultured CD4+ cells varies among infected individuals. *Cell Immunol*, 119, 470-475.

Walz, A. (1992). Generation and properties of neutrophil-activating peptide 2. *Cytokines*, 4:77-95, 77-95.

Walz, A., & Baggiolini, M. (1990). Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J Exp Med*, 171, 449-454.

Walz, A., Meloni, F., Clark-Lewis, I., von Tscharnher, V., & Baggiolini, M. (1991). [Ca²⁺]_i changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA. *J Leukoc Biol*, 50, 279-286.

Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H., & Baggiolini, M. (1987). Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 149, 755-761.

Wang, J.M., Hishinuma, A., Oppenheim, J.J., & Matsushima, K. (1993). Studies of binding and internalization of human recombinant monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by monocytic cells. *Cytokine*, 5, 264-275.

Wang, J.M., McVicar, D.W., Oppenheim, J.J., & Kelvin, D.J. (1993). Identification of RANTES receptors on human monocytic cells: competition for binding and desensitization by homologous chemotactic cytokines. *J Exp Med*, 177, 699-705.

Wang, S.Y., Mak, K.L., Chen, L.Y., Chou, M.P., & Ho, C.K. (1992). Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotypes

Webb, L.M., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., & Rot, A. (1993). Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7158-7162.

Weis, J.J., Ma, Y., & Erdile, L.F. (1994). Biological activities of native and recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: dependence on lipid modification. *Infect Immun*, 62, 4632-4636.

White, D.O., & Fenner, F.J. (1994). Medical Virology. 4th edition. Academic press, San Diego.

Wolpe, S.D., & Cerami, A. (1989). Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J*, 3, 2565-2573.

Wolpe, S.D., Davatelis, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D.G., Nguyen, H.T., Moldawer, L.L., Nathan, C.F., Lowry, S.F., & Cerami, A. (1988). Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med*, 167, 570-581.

Wooten, R.M., Modur, V.R., McIntyre, T.M., & Weis, J.J. (1996). *Borrelia burgdorferi* outer membrane protein A induces nuclear translocation of nuclear factor-kappa B and inflammatory activation in human endothelial cells. *J Immunol*, 157, 4584-4590.

Wright, S.C., Jewett, A., Mitsuyasu, R., & Bonavida, B. (1988). Spontaneous cytotoxicity and tumor necrosis factor production by peripheral blood monocytes from AIDS patients. *J Immunol*, 141, 99-104.

Wright, S.D., & Jong, M.T. (1986). Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 164, 1876-1888.

Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanaka, S., Appella, E., Kuratsu, J., & Leonard, E.J. (1989). Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med*, 169, 1449-1459.

Zachariae, C.O., Anderson, A.O., Thompson, H.L., Appella, E., Mantovani, A., Oppenheim, J.J., & Matsushima, K. (1990). Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J Exp Med*, 171, 2177-2182.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Blumenstein, M., Kafferlein, E., Kieper, D., Petersmann, I., Endres, S., Flegel, W.A., Northoff, H., Riethmuller, G., & Haas, J.G. (1992). In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunology*, 75, 264-268.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., & Riethmuller, G. (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with

Ziegler-Heitbrock, H.W., Wedel, A., Schraut, W., Strobel, M., Wendelgass, P., Sternsdorf, T., Bauerle, P.A., Haas, J.G., & Riethmuller, G. (1994). Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem*, 269, 17001-17004.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren
Universitätsprofessoren und Dozenten:

Aumüller, Barth, Beato, Bestgen, Elsässer, Fischer, Frenking, Fruhstorfer, Fuhs,
Garten, Gemsa, Golenhofen, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Haustein, Herrler,
Ihm, Jungclas, Kaffarnik, Käuser, Kern, Kirchner, Kleine, Klenk, Koch, Koolmann,
Kunz, Lang, Lauer, Lefkovits, Lohöfer, M. Löffler, H. Löffler, Lührmann, R. Müller,
U. Müller, Niessing, Oppen, Petzold, Reufel, Rogausch, Röhm, Schachtschnabel,
Schindler, Schulz, Schwarz, Sedlacek, Seifart, Seitz, Slenczka, Suske, Unsicker,
Voigt, von Löw, Waßmuth, Wesemann, Westermann, Westphal, Wiegandt.,

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. Gernschatz der mir die Anfertigung der vorliegenden Dissertation ermöglichte. Für seine fachliche Beratung und seine Diskussionsbereitschaft möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Dr. Hans Sprenger für die gute Zusammenarbeit. Seine hervorragende fachliche Betreuung und konstruktiven Vorschläge sowie seine ständige Ansprechbarkeit waren eine große Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts bedanke ich mich für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bei der Lösung aller aufgetretenen Probleme und die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. P. Mühler, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig und Prof. Dr. M. Simon und Dr. T. Stehle, Max Planck Institut für Immunbiologie in Freiburg, danke ich für die Überlassung der bakteriellen Moduline MALP-2 bzw. OspA. Prof. Dr. Schlöndorff und Dr. B. Luckow, Ludwig Maximilians Universität München, stellten mir freundlicherweise die Antikörper gegen die Chemokinrezeptoren CCR 2 und CCR 5 zur Verfügung.

Besonders bedanken möchte ich mich weiterhin bei meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung wäre das Studium der Humanbiologie und die Durchführung der Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Kerstin und meine Tochter Laura bitte ich, meine häufige Abwesenheit zu entschuldigen und bedanke mich für ihr großes Verständnis.

Diese Arbeit wurde durch ein Promotions-Stipendium der Hessischen Förderung von Nachwuchswissenschaftlern unterstützt.